



PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOINGENIERÍA  
INSTITUTO DE BIOINGENIERÍA  
UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

# **MODULACIÓN DE LA MASA DE LA CÉLULA ALFA PANCREÁTICA EN UN MODELO MURINO DE DIABETES AUTOINMUNE EXPERIMENTAL**



Memoria presentada por:

**Eva María Brú Tarí**

Para optar al grado de doctor

Dirigida por:

Dr. Iván Quesada Moll

**Elche, 2019**





## PREFACIO

Como requisito de la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, este documento, correspondiente a la tesis doctoral titulada: “**Modulación de la masa de la célula alfa pancreática en un modelo murino de diabetes autoinmune experimental**”, comprende:

- Una introducción en la que se presenta la investigación realizada y en la que el propósito de esta tesis doctoral es explicado y justificado.
- Un resumen de los materiales y métodos empleados en la investigación.
- Un resumen de los resultados obtenidos, su discusión y conclusiones finales.

El presente trabajo es presentado junto con el artículo:

*Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model of experimental autoimmune diabetes*

**Eva Bru-Tari**, Nadia Cobo-Vuilleumier, Paloma Alonso-Magdalena, Reinaldo S. Dos Santos, Laura Marroquí, Angel Nadal, Benoit R. Gauthier, Ivan Quesada.

**Scientific Reports**, 2019 Jul 2;9(1):9515. doi: 10.1038/s41598-019-45853-1.

empleado como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral mediante compendio de publicaciones y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.





Dr. **IVAN QUESADA MOLL**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández,

AUTORIZA:

La presentación en formato de Tesis por Compendio de Publicaciones de la tesis doctoral titulada: “**Modulación de la masa de la célula alfa pancreática en un modelo murino de diabetes autoinmune experimental**”, desarrollada dentro del Programa de Doctorado en Bioingeniería bajo mi dirección, cuya autora es **Dña. Eva María Brú Tarí**. La tesis se presenta junto al artículo:

*Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model of experimental autoimmune diabetes*

**Eva Bru-Tari**, Nadia Cobo-Vuilleumier, Paloma Alonso-Magdalena, Reinaldo S. Dos Santos, Laura Marroquí, Angel Nadal, Benoit R. Gauthier, Ivan Quesada.

**Scientific Reports**, 2019 Jul 2;9(1):9515. doi: 10.1038/s41598-019-45853-1.

Cumpliendo con la normativa del RD99/2011 y la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste y a los efectos oportunos firmo la presente autorización, en Elche a

**IVAN QUESADA MOLL**

Catedrático de Nutrición y Bromatología

Dpto. Biología Aplicada

Universidad Miguel Hernández





Dr. **IVAN QUESADA MOLL**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**Modulación de la masa de la célula alfa pancreática en un modelo murino de diabetes autoinmune experimental**”, presentado por **Dña. Eva María Brú Tarí** para optar al grado de doctor, ha sido realizado bajo mi dirección y supervisión en el Instituto de Bioingeniería, y que se encuentra en condiciones de ser defendido ante el tribunal correspondiente nombrado por esta universidad.

Y para que así conste y a los efectos oportunos firmo el presente certificado, en Elche a

**IVAN QUESADA MOLL**

Catedrático de Nutrición y Bromatología

Dpto. Biología Aplicada

Universidad Miguel Hernández





Dr. **JOSÉ MANUEL PÉREZ PÉREZ**, Coordinador del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 0169/17, de 1 de febrero 2017:

CERTIFICA

Que la tesis doctoral titulada: **“Modulación de la masa de la célula alfa pancreática en un modelo murino de diabetes autoinmune experimental”**, ha sido realizada por **Dña. Eva María Brú Tarí**, bajo la dirección del Profesor Ivan Quesada Moll y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Estudios de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firmo el presente certificado, en Elche a





## Financiación

El presente trabajo se ha desarrollado gracias a la financiación procedente del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación (AEI), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER): BFU2013-42789, concedida al Dr. Ivan Quesada Moll.



**UNIÓN EUROPEA**  
Fondo Europeo de  
Desarrollo Regional

Biblioteca Miguel Hernández



## **ÍNDICE**

ABREVIATURAS - 15

RESUMEN - 17

ABSTRACT - 18

### **I. INTRODUCCIÓN - 21**

**I.1.** El páncreas endocrino y la homeostasis de la glucosa - 21

**I.2.** Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) - 25

I.2.1. Etiología de la DM1 y destrucción de las células beta pancreáticas - 25

I.2.2. Modelos murinos de DM1 - 31

**I.3.** Dinámica de la masa y plasticidad de los islotes de Langerhans - 37

**I.4.** Fisiopatología de la célula alfa pancreática en la DM1 - 43

### **II. OBJETIVOS - 49**

### **III. MATERIAL Y MÉTODOS - 53**

**III.1.** Modelo animal e inducción de la destrucción de las células beta pancreáticas - 53

**III.2.** Medidas hormonales en plasma y páncreas - 53

**III.3.** Preparación de muestras histológicas - 54

**III.4.** Análisis inmunohistoquímico de la masa y tasa de proliferación de la célula alfa pancreática - 55

**III.5.** Técnicas de inmunofluorescencia - 56

**III.6.** Grado de insulinitis y glucagón - 59

**III.7.** Representación y análisis estadístico de los datos - 60

### **IV. RESULTADOS - 63**

**IV.1.** Desarrollo de la diabetes autoinmune experimental (EAD) - 63

**IV.2.** Caracterización del modelo de EAD en un estadio temprano de diabetes - 64

**IV.3.** Estudio de la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en un estadio temprano de diabetes - 66

**IV.4.** Caracterización del modelo de EAD en un estadio avanzado de diabetes - 71

**IV.5.** Estudio de la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en un estadio avanzado de diabetes - 72

**IV.6.** Presencia de mecanismos de transdiferenciación celular en los ratones diabéticos durante el desarrollo natural de EAD - 77

## **V. DISCUSIÓN - 83**

**V.1.** El modelo murino RIP-B7.1 de diabetes autoinmune experimental - 83

**V.2.** Balance de la masa de la célula alfa pancreática en la diabetes autoinmune experimental - 85

**V.3.** Posible contribución de los procesos de transdiferenciación celular en el balance de la masa de la célula alfa pancreática durante el desarrollo natural de EAD - 88

## **VI. CONCLUSIONES - 97**

## **VII. BIBLIOGRAFIA - 101**

## **ANEXO I - 115**

Agradecimientos - 136



## ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ALX:** Aloxano

**APC:** Célula presentadora de antígenos

**ARN:** Ácido ribonucleico

**Arx:** *Aristaless-related homeobox*

**BCR:** Receptor de los linfocitos B

**BSA:** Suero de Albúmina Bovino

**CD80:** *Cluster of differentiation 80*. (Cúmulo de diferenciación 80)

**CTLA4:** antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico

**DAB:** 3,3'-diaminobencidina

**DM1:** Diabetes Mellitus tipo 1

**DM2:** Diabetes Mellitus tipo 2

**EAD:** *Experimental Autoimmune Diabetes* (Diabetes autoinmune experimental)

**EDTA:** *Ethylenediaminetetraacetic acid*. (Ácido etilendiaminotetraacético)

**ELISA:** *EnzymLinked Immunoabsorbent Assay*

**FBS:** Suero fetal bovino

**GAD65:** Isoforma 65 de la glutamato decarboxilasa

**Gcgr:** Receptor de glucagón

**GIP:** Polipéptido inhibidor gástrico

**GLP-1:** Péptido 1 similar al glucagón

**H-2:** Complejo de histocompatibilidad 2

**HLA:** Antígenos de leucocitos humanos

**hPSC:** Células madre pluripotentes humanas

**IA-2:** Antígeno-2 de células del islote

**IFN $\gamma$ :** Interferón gamma

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL2RA:** Receptor alfa de la interleucina 2

**INS:** Insulina

**LCMV:** Virus *Lymphocytic Chroriomeningitis*

**MafA/B:** *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A/B*

**MHC I/II:** complejo mayor de histocompatibilidad de clase I / II

**Ngn3:** *Neurogenin 3*

**NeuroD1:** *Neuronal differentiation 1*

**Nkx2.2:** *NK2 homeobox 2*

**Nkx6.1:** *NK6 homeobox 1*

**NOD:** *Non-Obese Diabetic* (No Obeso Diabético)

**Pan-CK:** *Pan-cytokeratin* (pan-citoqueratina)

**PARP:** poli (ADP-ribosa) polimerasa

**Pax4/6:** *paired box 4 /6*

**PBS:** *Phosphate buffered saline*. (Tampón Fosfato Salino)

**PCNA:** *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (Antígeno nuclear de proliferación celular)

**Pdx1:** *Pancreatic and duodenal homeobox-1*.

**PpIns:** Preproinsulina

**PTPN22:** Proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 22

**RE:** Retículo endoplásmico

**RIP:** *Rat Insulin Promoter* (Promotor de insulina de rata)

**SEM:** Error estándar

**SIM:** Microscopia de iluminación estructurada

**STZ:** Estreptozotocina

**TCR:** Receptor de los linfocitos T

**TNF $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TUNEL:** *TdT-mediated dUTP Nick End Labeling*

**UBASH3A:** proteína A del dominio SH3 asociado a ubiquitinas

**ZnT8:** transportador de zinc 8



## RESUMEN

La pérdida de la población beta pancreática y su regeneración han sido los temas centrales en la investigación de la diabetes mellitus tipo 1 (DM1). A pesar de la importancia de la célula alfa en la etiología y complicaciones de la DM1, existe poca información acerca de la masa de este tipo celular y su modulación en esta enfermedad. Además, investigaciones recientes han evidenciado que este tipo celular constituye un potencial reservorio celular para la regeneración de la población beta pancreática. El estudio de la regulación de la masa de la célula alfa en la DM1 constituye una importante fuente de información a la hora de elucidar los mecanismos que contribuyen a la fisiopatología de la DM y de crear estrategias para la regeneración de las células beta. En la presente tesis doctoral, se ha caracterizado la masa de la célula alfa así como los procesos que la modulan en dos estadios de diabetes autoinmune: diabetes temprana, una semana tras el comienzo de la enfermedad, y diabetes avanzada, cuatro semanas tras el debut. Para ello, se empleó el modelo murino inducible de diabetes autoinmune experimental RIP-B7.1. Todos los animales diabéticos presentaron insulinitis, hiperglicemia, hipoinsulinemia e hiperglucagonemia, junto a una marcada disminución del contenido total pancreático de insulina. En la diabetes temprana, la masa de la célula alfa y el contenido total pancreático de glucagón no presentaron cambios significativos respecto al grupo control, mientras que en la fase avanzada ambos parámetros sufrieron una disminución. En ambos estadios, el tamaño de la célula alfa, la proliferación y la neogénesis ductal se encontraron aumentados, mientras que la tasa de apoptosis en este tipo celular fue insignificante. El estudio de potenciales marcadores de transdiferenciación celular reveló un incremento, en ambos estadios, de la proporción de células bi-hormonales, positivas tanto para insulina como para glucagón, y de células positivas para glucagón con expresión del factor de transcripción PDX1, específico de las células beta. Estos hallazgos sugieren que la célula alfa experimenta diversos procesos de remodelación durante el transcurso de la diabetes autoinmune experimental, que puede estar ligado al mantenimiento de la población funcional de células alfa y/o a la regeneración de la población beta pancreática mediante transdiferenciación de las células alfa.

## **ABSTRACT**

Type 1 diabetes (T1D) studies have been focused on the loss and regenerative strategies of the pancreatic beta-cell population. Nevertheless, despite the role of the alpha-cell in the etiology and complications of T1D, there is a lack of knowledge about the modulation of the pancreatic alpha-cell mass in this pathology. Additionally, recent findings have presented the alpha-cell as a plastic cell with great potential as a reservoir for beta-cell regeneration. Thus, the understanding of the modulation of the alpha-cell mass could be of outstanding importance for the elucidation of contributive factors involved in T1D pathophysiology and for the implementation of beta-cell regeneration strategies. In the present doctoral thesis, the pancreatic alpha-cell mass and its modulatory processes have been characterized in two stages of the disease: early-onset, one-week after diabetes debut, and an advanced stage, four weeks after the onset. The transgenic RIP-B7.1 mice model of experimental autoimmune diabetes (EAD) was employed in this study. In both stages, diabetic mice presented insulinitis, hyperglycaemia, hypoinsulinemia and high plasmatic glucagon levels along with a significative reduction of the pancreatic insulin content. In the early-onset of EAD, alpha-cell mass and pancreatic glucagon content were preserved, while both parameters were reduced in the advanced phase. At both diabetic phases, alpha-cell size, proliferation and ductal neogenesis were increased, whereas apoptosis was almost negligible. Interestingly, we found an increase in markers of alpha-cell transdifferentiation into beta-cells during EAD. In both the early-onset and advanced stages, diabetic mice showed an increase in the proportion of bihormonal cells positive for insulin and glucagon or positive for both glucagon and the beta-cell transcription factor PDX1. Our findings suggest that alpha-cell renewal mechanisms are up-regulated during the natural course of EAD, possibly as an attempt to maintain a functional alpha-cell population and/or to increase beta-cell regeneration via alpha-cell transdifferentiation.





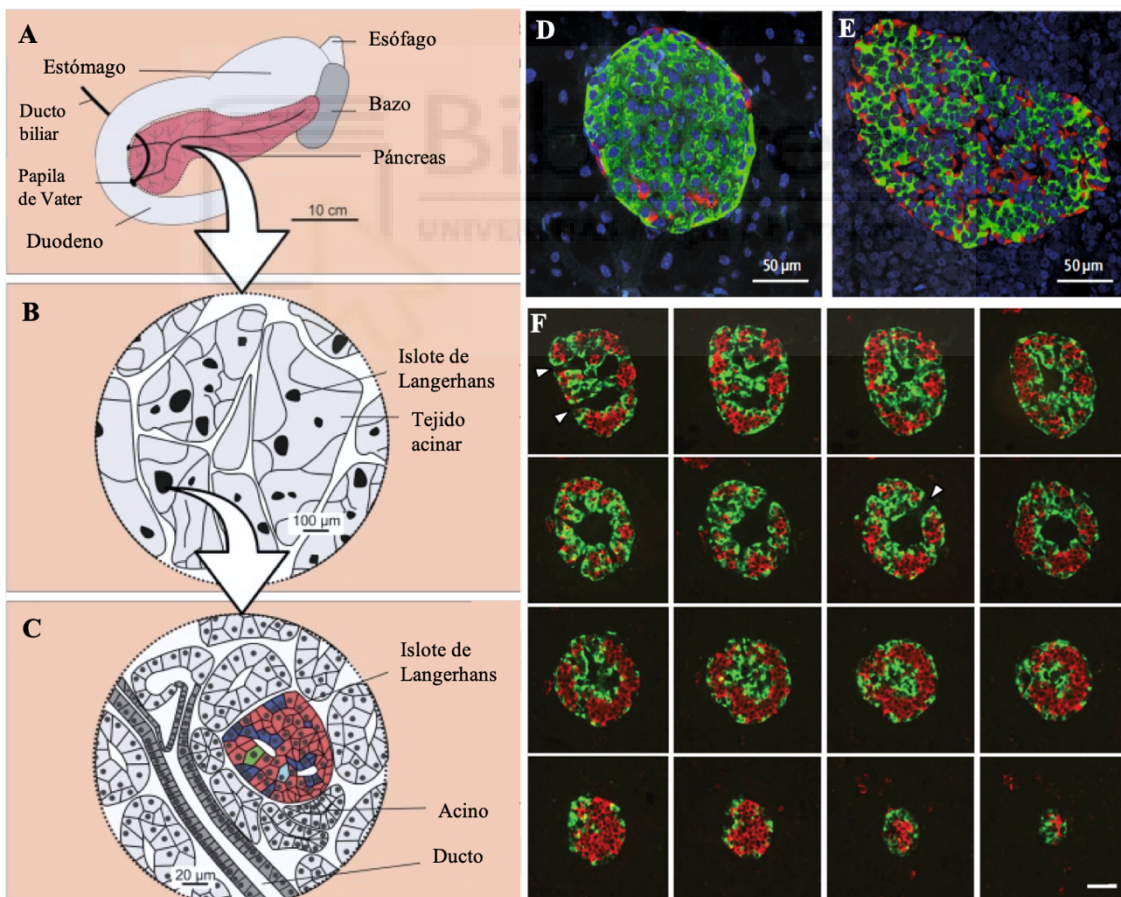
## **I. INTRODUCCIÓN**



# I. INTRODUCCIÓN

## I.1. El páncreas endocrino y la homeostasis de la glucosa.

El páncreas es una glándula del sistema digestivo con función mixta exocrina-endocrina. Está compuesto por cuatro elementos funcionales diferentes: tejido acinar, epitelio ductal, tejido conectivo y las células endocrinas de los islotes de Langerhans. Estos elementos están íntimamente relacionados de forma ontogénica, anatómica, histológica y funcional. Las células exocrinas componen un 98% del volumen del órgano y liberan una mezcla de enzimas digestivas y bicarbonato al duodeno. Estas células están organizadas en estructuras conocidas como acinos y se encuentran interrelacionadas con el epitelio ductal pancreático (Fig. 1). Los islotes de Langerhans constituyen la porción endocrina del páncreas y componen el 1-2% del órgano. Se encuentran distribuidos en el tejido entre los acinos y las estructuras ductales (Fig. 1). A lo largo de este apartado se detallará la estructura de los islotes de Langerhans, su función e implicación en la homeostasis de la glucosa.



**Figura 1. Anatomía macroscópica y microscópica del páncreas.** (A) Anatomía macroscópica del páncreas. (B y C) Magnificación mostrando los distintos componentes funcionales del páncreas. Modificado de [1]. Imágenes representativas de islotes de Langerhans de ratón (D) y humano (E) , donde se pueden observar las células alfa en rojo y beta en verde. (F) Imágenes mostrando la citoarquitectura del islote de Langerhans humano mediante la captura de secciones consecutivas del islote. Se pueden observar las células beta en rojo y las alfa en verde. Modificado de [2].

### Anatomía microscópica del Islote de Langerhans

Los islotes de Langerhans son micro-órganos compuestos por distintos tipos celulares localizados en el páncreas y separados del tejido exocrino por una fina capa de colágeno [3]. Estas estructuras multicelulares fueron descritas por primera vez en 1869 por Paul Langerhans [4] y son las encargadas de la producción y liberación al torrente sanguíneo de distintas hormonas involucradas principalmente en el control de la homeostasis de la glucosa. En el páncreas del humano adulto existen aproximadamente un millón de islotes. Cada islote presenta un diámetro de 50 a 250  $\mu\text{m}$  y está compuesto por 1000-2000 células, entre las que se pueden encontrar cinco tipos celulares distintos, caracterizados por la secreción de una hormona específica:

- Células alfa ( $\alpha$ ), secretoras de glucagón.
- Células beta ( $\beta$ ), secretoras de insulina.
- Células delta ( $\delta$ ), productoras de somatostatina.
- Células gamma o PP, secretoras de polipéptido pancreático.
- Células épsilon ( $\epsilon$ ), secretoras de grelina.

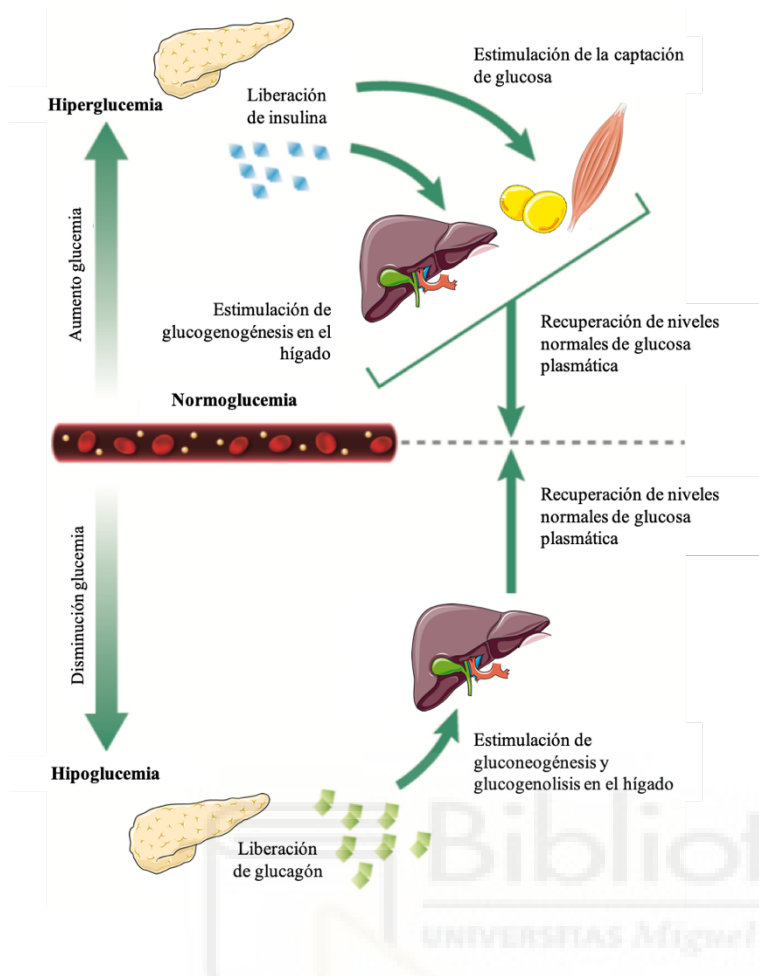
El porcentaje de los distintos tipos celulares que forman los islotes de Langerhans varía dependiendo de la especie. En humanos y roedores, el tipo celular mayoritario es la célula beta. Este tipo celular supone entre el 45-50% de las células de los islotes humanos y un 70-80% en ratones. El segundo tipo celular más abundante es la célula alfa, formando un 40-45% de los islotes humanos y entre un 15-20% en el ratón. Las demás poblaciones son minoritarias en ambas especies. Las células delta comprenden aproximadamente un 10% en ratones y alrededor de un 10-12% en humanos. Las células PP comprenden un 1% del islote en ambas especies y las células épsilon menos del 1%.

Los islotes de Langerhans están altamente vascularizados, presentando una densidad de capilares cinco veces mayor que el tejido exocrino pancreático [5, 6]. Esta microvasculatura en el islote determina en gran medida la comunicación entre las células endocrinas y exocrinas, así como entre los distintos tipos celulares del islote. Además, estas estructuras presentan innervación simpática y parasimpática, con diferencias entre humanos y roedores [1]. En los islotes humanos, las fibras simpáticas contactan de forma escasa con las células endocrinas, en cambio, las células musculares lisas de la microvasculatura están abundantemente innervadas. En los roedores los axones del sistema nervioso simpático innervan principalmente las células alfa pancreáticas, mientras que tanto las células alfa como beta presentan innervación parasimpática [7].

De forma general, la citoarquitectura o disposición espacial de los distintos tipos celulares en el islote humano se considera diferente a la de los roedores [8-11]. En los roedores existe cierta separación topográfica de las células beta, que se encuentran fundamentalmente en el cuerpo central del islote, con los demás tipos celulares dispuestos formando un manto en la periferia. En los islotes humanos, se ha descrito una disposición aleatoria de los distintos tipos celulares (**Fig. 1 D, E**) [8, 11]. Sin embargo, estudios recientes sostienen que los islotes humanos presentan distintas distribuciones celulares dependiendo de su tamaño. En islotes pequeños (40-60  $\mu\text{m}$  de diámetro), las células beta pancreáticas parecen encontrarse en el centro y las células alfa forman un manto en la periferia al igual que en los roedores [2, 12] (**Fig. 1 F**). Otros estudios han mostrado que las células se encuentran dispuestas de forma aleatoria formando subestructuras, cada una con una disposición celular similar a la de los islotes de los roedores [13]. Todos estos estudios sostienen que los islotes humanos presentan una citoarquitectura única con una mayor complejidad en los islotes de mayor tamaño, que favorece un mayor contacto heterólogo entre las células beta y alfa que en el islote del ratón [2]. El mayor contacto entre estos dos tipos celulares sugiere una mayor implicación de la regulación paracrina que el glucagón ejerce sobre la secreción de insulina en los islotes humanos en comparación con los roedores. En cambio, la disposición de las células beta y no-beta en el islote del ratón favorece el contacto homólogo entre células beta, lo que se ha descrito que mejora la función de este tipo celular, favoreciendo la sincronía funcional de las células beta [14].

### La homeostasis de la glucosa

El control de la homeostasis de la glucosa depende principalmente de la función de los islotes de Langerhans. Las células beta y las células alfa juegan un papel fundamental, constituyendo un sistema de regulación antagónica cuya acción está controlada por nutrientes, el sistema nervioso y las relaciones paracrinas entre las células que componen el islote. Estas células secretan sus respectivas hormonas gracias al acoplamiento entre el metabolismo de la glucosa y la actividad eléctrica de la célula, que da lugar a señales intracelulares de calcio y al proceso de exocitosis y liberación hormonal. Las células beta pancreáticas secretan insulina en respuesta a altas concentraciones de glucosa en sangre. Esta hormona ejerce un efecto anabólico en sus tejidos diana, fundamentalmente músculo, hígado y tejido adiposo, induciendo la incorporación de glucosa y su acumulación en forma de glucógeno y grasa. En cambio, el glucagón ejerce un efecto catabólico, principalmente activando en el hígado vías de señalización que inducen la glucogenolisis y gluconeogénesis, favoreciendo la liberación hepática de glucosa al torrente sanguíneo (**Fig. 2**).



**Figura 2. Homeostasis de la glucosa en condiciones fisiológicas.**

Las hormonas insulina y glucagón participan activamente en el mantenimiento de niveles normales de glucosa plasmática. En respuesta a hiperglucemia, las células beta pancreáticas liberan insulina, la cual estimula tanto la captación y almacenamiento de glucosa en distintos tipos celulares, así como la generación de glucógeno en el hígado. En cambio, en condiciones de hipoglucemia, las células alfa pancreáticas liberan glucagón. Esta hormona estimula la gluconeogénesis y glucogenólisis en el hígado, que favorece la liberación de glucosa al torrente sanguíneo. Modificado de [15].

El funcionamiento de este sistema de control es mucho más complejo y abarca la acción de varios factores que modulan la secreción hormonal. Además de los niveles de glucemia, existe un amplio rango de señales, nutrientes y factores capaces de influir sobre la secreción de las hormonas del islote de Langerhans [15-17]. La acción paracrina de las distintas hormonas pancreáticas sobre las propias células del islote ejerce un segundo sistema de control en la homeostasis de la glucosa. El glucagón estimula la liberación de insulina por parte de las células beta pancreáticas y actúa en las células delta, promoviendo la secreción de somatostatina. Esta hormona ejerce un efecto inhibitorio tanto en la secreción de insulina como de glucagón. En este complejo mecanismo de regulación también participan las incretinas, hormonas secretadas por el sistema gastrointestinal en respuesta a la ingesta. Las dos incretinas más relevantes son el polipéptido inhibitorio gástrico (GIP) y el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1). Ambas producen una disminución de la secreción de glucagón y un aumento de la secreción de insulina. El sistema nervioso simpático y parasimpático también presenta un importante papel en la regulación de la homeostasis de la glucosa, principalmente en respuesta a la disminución de los niveles de glucosa plasmática, promoviendo la secreción de glucagón para prevenir episodios de hipoglucemia [15].

La función de las células del islote y su desregulación son claves para el desarrollo de patologías como la Diabetes Mellitus. Esta enfermedad está caracterizada por presentar hiperglucemia de forma crónica, así como alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas. En la diabetes, las células beta pancreáticas no producen suficiente insulina para el mantenimiento de niveles normales de glucemia, bien sea por ausencia o pérdida de población beta pancreática, o bien por el desarrollo de una resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos y una insuficiente adaptación por parte de las células del islote a esta situación [17]. Además de defectos en la función de la insulina y la célula beta pancreática, las células alfa también presentan alteraciones que participan en la etiología y las complicaciones de la diabetes [17]. Se ha demostrado que en condiciones de diabetes, la secreción de glucagón se mantiene activa en condiciones de alta glucemia, causando una exacerbación de la hiperglucemia mediante la liberación de glucosa hepática. En cambio, en situaciones de bajas concentraciones de glucosa plasmática, las células alfa no responden con una secreción adecuada de glucagón, con lo que aumenta el riesgo de hipoglicemia en los pacientes [17].

## **I.2. Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1)**

Las enfermedades autoinmunes son un grupo de patologías caracterizadas por un sistema inmune reactivo contra células del propio organismo que causa daños en el tejido diana, produciendo un efecto nocivo en el sujeto que sufre esta alteración. Algunas de las enfermedades autoinmunes más comunes son la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la DM1. Todas estas patologías se caracterizan porque aún no se conocen profundamente todos los mecanismos que conllevan la destrucción autoinmune de los distintos tejidos afectados. La teoría más aceptada acerca del desarrollo de enfermedades autoinmunes es la combinación de predisposición genética con factores ambientales que favorecen el ataque autoinmune y rompen la tolerancia del sistema inmunológico. Durante este apartado se detallará la etiología de la DM1, los mecanismos del ataque autoinmune contra la célula beta pancreática así como los distintos modelos murinos para el estudio de esta enfermedad.

### **I.2.1. Etiología de la DM1 y destrucción de las células beta pancreáticas**

#### Etiología de la DM1

La Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1), también conocida como diabetes juvenil o diabetes insulino-dependiente, es una enfermedad crónica caracterizada por una deficiencia de insulina y la consecuente hiperglucemia, causadas por el ataque autoinmune diabetogénico que sufren las



células beta pancreáticas en los individuos que la padecen. La DM1 es una de las enfermedades crónicas autoinmunes más prevalentes que se diagnostican actualmente. En Europa se prevé un incremento anual de la incidencia en la niñez [18]. Esta patología afecta por igual a ambos sexos [19] y, a pesar de que normalmente se diagnostica durante la infancia, el debut de la DM1 puede ocurrir también en adultos [20]. De acuerdo con la Asociación Americana de Diabetes, el diagnóstico de esta patología se realiza al tener presente al menos un marcador de autoinmunidad o autoantígenos contra las células beta pancreáticas, combinado con uno de los siguientes criterios [21]:

- Glucemia en ayuno igual o superior a 7 mM.
- Glucemia igual o superior a 11.1 mM dos horas tras la ingestión de 1.75 g/kg de glucosa durante un test de tolerancia a la glucosa.
- Niveles de hemoglobina glicosilada (HbA1c) mayor o igual a 6.5%.
- Glucemia igual o superior a 11.1 mM acompañada por síntomas de hiperglucemia.

Los principales autoantígenos asociados con DM1 con disponibilidad de ensayos bioquímicos para su detección son la insulina, la isoforma 65 de la glutamato decarboxilasa (GAD65), el antígeno-2 de células del islote (IA-2) y el transportador de zinc 8 (ZnT8) [22].

La etiología de la DM1 es multifactorial e involucra tanto factores genéticos como ambientales. Esta patología está clasificada como un desorden poligénico. No obstante, alrededor del 80% de los diagnósticos de DM1 ocurre en pacientes sin historia familiar para la enfermedad, dejando el 20% de los casos como consecuencia aparente de la predisposición genética. El riesgo de padecer diabetes autoinmune para la población general se encuentra en un 0.4%, en cambio, aumenta a un 6% en la descendencia de pacientes con DM1, entre un 5-10% en mellizos y un 50% en gemelos idénticos [23, 24]. De forma general se puede alegar que la autoinmunidad está causada por una alteración en el balance entre la inducción de tolerancia inmunológica y la capacidad de respuesta del sistema inmunológico. La tolerancia hacia moléculas propias se establece y se mantiene gracias a mecanismos complejos que tienen lugar en el timo (tolerancia central) y en los nódulos linfáticos periféricos (tolerancia periférica). La pérdida de tolerancia inmunológica mediante fallos en la selección negativa de linfocitos T autorreactivos podría ser un desencadenante de la DM1 [22]. Tanto la tolerancia como la respuesta del sistema inmunológico dependen de la presentación antigénica llevada a cabo por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II (MCH I y MCH II, respectivamente). En individuos genéticamente susceptibles, modificaciones genéticas en el MCH II podría ocasionar la presentación de péptidos propios, conduciendo a una selección negativa inadecuada de poblaciones de linfocitos T, reactivos contra péptidos de la célula beta pancreática [22]. Los genes que codifican antígenos de leucocitos humanos (HLA) en el MHC II en el cromosoma 6,

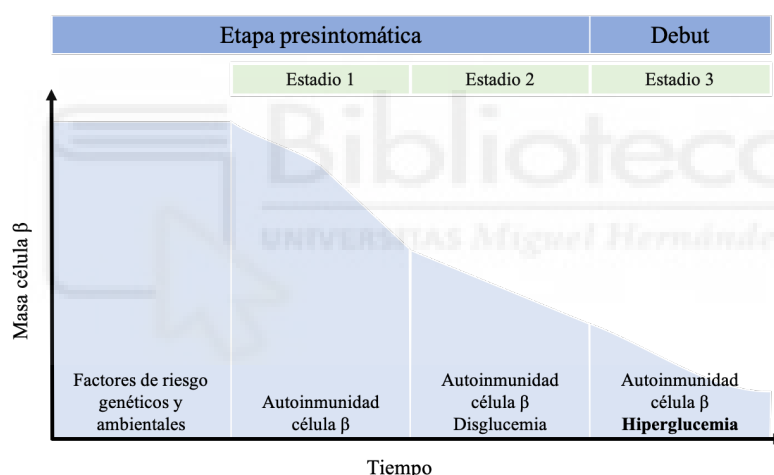


confieren alrededor del 50% de la susceptibilidad genética que define el riesgo de desarrollar DM1 [25, 26]. La mayoría de los pacientes con DM1 presentan el haplotipo HLA-DBR1\*0301-DQ1\*0201 (conocido como DR3-DQ2) o el haplotipo HLA-DBR1\*0401-DQB1\*0302 (DR4-DQ8). La presencia de ambos haplotipos confiere una gran susceptibilidad a padecer DM1. No obstante, el mecanismo mediante el cual las variantes en el MHC II intervienen en la susceptibilidad a padecer DM1 continúa sin elucidar. Se ha postulado que modificaciones en la secuencia génica de los genes que codifican HLA podrían influir en el proceso de presentación de antígenos, modulando la reactividad de las células del sistema inmunológico y/o la selección negativa de las mismas, lo que tendría una gran influencia en el proceso de inducción de tolerancia hacia antígenos propios [22]. De forma adicional, se han descrito variantes en genes que codifican insulina (INS) [27], el antígeno-4 asociado al linfocito T citotóxico (CTLA4) [28], la proteína tirosina fosfatasa no receptora de tipo 22 (PTPN22) [29], el receptor alfa de la interleucina 2 (IL2RA) [30] y la proteína A del dominio SH3 asociado a ubiquitinas (UBASH3A) [31], las cuales están implicadas en la regulación de la respuesta inmune y se han asociado con DM1 [32], pudiendo influenciar la susceptibilidad a padecer esta enfermedad.

Entre los principales agentes ambientales que se han sido propuestos como factores contribuyentes para el desarrollo de la DM1, se incluyen infecciones virales y componentes de la dieta [33]. La infección por el herpes virus 6 humano, el enterovirus, el parainfluenza virus y el virus de las paperas se ha asociado con DM1 fulminante, una forma de diabetes tipo 1 con un debut abrupto y una destrucción severa de las células beta pancreáticas [34]. En cambio, las infecciones enterovirales, principalmente por coxsackievirus B2 y B4, están relacionadas con el desarrollo de DM1. Anticuerpos contra estos virus se encuentran de forma frecuente en la sangre de pacientes recién diagnosticados [35]. Los mecanismos mediante los cuales la infección con enterovirus conlleva la destrucción de las células beta pancreáticas es objeto de debate. Se postula que las infecciones virales podrían activar la autoinmunidad contra las células beta pancreáticas mediante la activación de los linfocitos T o por mimetismo molecular entre las secuencias antigénicas de los virus y las células beta [36]. Otros mecanismos podrían involucrar daño celular directo por la replicación vírica, ocasionando la liberación de antígenos de las células beta [37]. Entre los componentes de la dieta como factores de riesgo de DM1 se ha propuesto la introducción temprana en la dieta de las proteínas de la leche de vaca [38] y la deficiencia de vitamina D, así como alteraciones en genes asociados a esta vitamina [39-41].

## Fisiopatología de la DM1

La DM1 está caracterizada por un infiltrado linfocitario o insulitis en los islotes de Langerhans y la pérdida de la población beta pancreática, lo cual aumenta con la duración de la enfermedad [20]. Esta enfermedad progresa de forma secuencial, habiéndose descrito tres etapas distintas en su desarrollo [21] (**Fig. 3**). En primer lugar, una fase asintomática en la que se encuentran evidencias de destrucción de la población beta pancreática, como la detección serológica de autoanticuerpos asociados con DM1, pero sin alteraciones en la glucemia (estadio 1 de la DM1). El comienzo de la destrucción de la población beta pancreática conduce al estadio 2, en el que el paciente presenta alteraciones en la homeostasis de la glucosa o disglucemia. Finalmente, el desarrollo sintomatológico de la enfermedad, o estadio 3, ocurre cuando aproximadamente el 70% de los islotes de Langerhans se encuentran desprovistos de células beta productoras de insulina [20]. No obstante, estudios recientes han mostrado una masa residual de células beta en el páncreas de pacientes tras décadas después del diagnóstico de la enfermedad, independientemente de la duración de la enfermedad o la edad del diagnóstico [42].



**Figura 3.** Estadios de la progresión de la diabetes tipo I. Adaptada de [43].

Debido a la dificultad de obtener muestras humanas, la mayor parte de la información acerca de los mecanismos de la destrucción de las células beta en la DM1 proviene de estudios realizados en modelos murinos de DM1 o en islotes o células beta de ratón. La implicación del sistema inmune en el desarrollo de la DM1 en humanos ha sido evidenciada al observar una mejora de la supervivencia de la célula beta tras la administración de ciclosporina, un fármaco inmunosupresor que disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias en los linfocitos T [44]. A pesar de que no se conocen los mecanismos exactos que llevan al inicio de la enfermedad y la muerte de las células beta, se puede afirmar que la destrucción de esta población se produce al menos parcialmente por un proceso autoinmune, debido a la presencia de células del sistema inmune (conocida como insulitis) en los islotes positivos para insulina de

pacientes recién diagnosticados [45]. Estas infiltraciones linfocitarias están formadas mayoritariamente por linfocitos T CD8+, seguidos en abundancia por macrófagos, linfocitos T CD4+ y linfocitos B [45]. Por ello, a pesar de la presencia serológica de autoanticuerpos dirigidos contra las células beta, la destrucción de esta población parece ser llevada a cabo principalmente por linfocitos T. En general, los linfocitos T autorreactivos adquieren la habilidad para migrar a su tejido diana cuando son activados. Esta activación, en individuos genéticamente susceptibles para DM1, podría tener lugar en los nódulos linfáticos pancreáticos, mediante la presentación de antígenos derivados de las células beta pancreáticas por parte de células presentadoras de antígenos (APC). De forma previa a la activación de los linfocitos T autorreactivos se requiere la pérdida de la tolerancia inmunológica hacia antígenos propios de la célula beta. En individuos susceptibles esta desregulación del sistema inmunológico podría ocurrir en etapas tempranas de la vida y puede estar relacionada con la liberación de antígenos propios de la célula beta pancreática como consecuencia de los eventos de apoptosis que tienen lugar de forma fisiológica tras el nacimiento [46]. Además, los linfocitos T podrían activarse en respuesta a infecciones virales, debido a la presentación de antígenos con similitudes a aquellos que proporcionan reactividad contra las células beta, como se ha explicado anteriormente en el caso del mimetismo molecular [47]. Tras su activación y acceso a los islotes, los linfocitos T entran en contacto con su correspondiente antígeno e inician el proceso inmunológico que conlleva la destrucción de las células beta. Los linfocitos CD4+ secretan citoquinas proinflamatorias, principalmente interferón gamma ( $IFN\gamma$ ) y quimiocinas, lo que resulta en el reclutamiento de más células del sistema inmunológico [48, 49]. La liberación de  $IFN\gamma$  incrementa la activación de APC y exagera la producción de citoquinas proinflamatorias, incluyendo interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ).  $IFN\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  inducen la formación de especies reactivas de oxígeno, incluyendo la producción de óxido nítrico por parte de las células beta, ocasionando daño celular y apoptosis [50]. Además de la activación de las APC, los linfocitos T CD4+ también activan a los linfocitos T CD8+. El reconocimiento de antígenos de las células beta por los linfocitos T CD8+ causa la secreción de granzimas y perforinas, y por tanto, la destrucción de las células beta [51]. Este proceso empeora durante la evolución de la DM1, debido a la progresión de la insulinitis y a la liberación de antígenos tras la muerte de las células beta [52].

## Estrategias terapéuticas para la DM1

El tratamiento actual para los pacientes con DM1 es la administración de insulina exógena. No obstante, el control de la glucemia y la prevención de episodios de hipoglucemia no es preciso en estos pacientes, lo que conlleva un alto riesgo de padecer complicaciones asociadas a la DM1 como retinopatías, neuropatías, nefropatías y enfermedades cardiovasculares. La investigación para mejorar el control de la glucemia en la DM1 se está llevando a cabo en tres áreas principales: nuevas formas de insulina exógena y sistemas de liberación de la hormona, reemplazo de las células del islote y terapias adyuvantes a la insulina [53]. El reemplazo de las células beta parece ser la única alternativa a la administración de insulina en pacientes con DM1. El trasplante de islotes de Langerhans de donantes fallecidos proporciona células beta productoras de insulina, ayuda al control de la glucemia y atrasa complicaciones derivadas de la hiperglucemia en los pacientes receptores [54, 55]. Sin embargo, los pacientes que reciben el trasplante necesitan tratamientos inmunosupresores para evitar su rechazo [56] y la efectividad del tratamiento generalmente suele ser de menos de cinco años, momento a partir del cual vuelven a necesitar la administración de insulina exógena [57]. Los efectos dañinos de los fármacos inmunosupresores, la falta de independencia de insulina y la necesidad de un mayor número de donantes causan que este tratamiento no sea viable para la mayoría de pacientes con DM1 [58]. Estas consideraciones sostienen la importancia de buscar fuentes alternativas de células beta con el fin de curar la diabetes y no solo ofrecer un tratamiento temporal. Esta fuente de células beta podría obtenerse a partir de procedimientos *in vitro* o por regeneración *in vivo*. La generación *in vitro* de células productoras de insulina a partir de células madre pluripotentes humanas (hPSC) ha conseguido un modelo celular capaz de secretar insulina en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa y de disminuir la glucemia en ratones diabéticos [59]. En otro estudio, Manzar y colaboradores emplearon hPSC derivadas de pacientes con DM1 para generar células productoras de insulina, con capacidad de normalizar la glucemia en ratones diabéticos tras su trasplante [60]. Esta estrategia presenta la ventaja de no requerir tratamientos de inmunosupresión al emplear células propias y eliminaría la necesidad de emplear donantes. A pesar de que estos resultados son prometedores, las terapias de reemplazo celular para DM1 requieren el aislamiento de las células productoras de insulina para evitar su destrucción autoinmune. El encapsulamiento de islotes de donantes es una estrategia que se ha estudiado para protegerlos de la respuesta inmunológica del huésped. No obstante, la diferenciación de las hPSC puede verse afectada por el encapsulamiento [61] y se requieren más estudios para promover su uso como terapia. Recientemente, Furuyama y colaboradores han logrado generar células productoras de insulina a partir de células alfa pancreáticas humanas que consiguen curar la diabetes en ratones tras la ablación de la población beta pancreática [62]. Estas células productoras de insulina mantienen parte de la identidad de las células alfa pancreáticas y son

menos inmunogénicas que las células beta [62]. El desarrollo de terapias que promuevan la interconversión de células del islote implicaría la generación de células productoras de insulina sin la necesidad de emplear procedimientos invasivos como el trasplante de islotes o la diferenciación *ex vivo* de células pluripotentes. Las células alfa son una diana potencial para la generación de células beta funcionales y el estudio de su biología y función en la DM1 es de gran importancia para la generación de estrategias de reemplazo celular.

### **I.2.2. Modelos murinos de DM1.**

La variabilidad interindividual que presentan los pacientes de DM1, la intervención de factores genéticos y epigenéticos en el desarrollo de la enfermedad y la inaccesibilidad anatómica del páncreas, dificultan en gran medida el avance del estudio de la enfermedad en humanos. Por ello, la utilización de modelos animales de DM1 es imprescindible. Entre los modelos murinos más empleados se encuentran el ratón NOD (*Non-Obese Diabetic*, No Obeso Diabético), que desarrolla diabetes autoinmune de forma espontánea, y los modelos de inducción química de diabetes. Además, se han desarrollado distintos modelos transgénicos en los que la expresión de transgenes bajo el control de RIP (*Rat Insulin Promoter*, promotor de insulina de rata) permite la expresión del transgén de interés en las células beta pancreáticas. La expresión de antígenos bajo el control de RIP, como proteínas del virus *Lymphocytic Choriomeningitis* (LCMV), pueden servir como dianas del ataque inmune tras la infección con dicho patógeno [63]. En cambio, la expresión de moléculas estimuladoras del sistema inmune, como B7.1 o CD80, pueden incrementar la susceptibilidad de las células beta a la destrucción autoinmune [64]. En este apartado, se detallarán las características de los principales modelos murinos de DM1.

#### Modelo de DM1 espontánea: ratón NOD

El modelo murino NOD de DM1 espontánea fue desarrollado en el año 1974 [65]. Esta cepa presenta distintos defectos en la tolerancia inmunológica que conllevan a la infiltración de células del sistema inmune en el páncreas, la destrucción autoinmune de las células beta y DM1 de forma espontánea [66, 67]. Desde su creación, este ratón se ha convertido en el modelo de referencia para la investigación en DM1 debido a sus similitudes con la DM1 humana. La más destacable es la analogía estructural del MHC clase II del ratón NOD con el complejo humano, que puede conferir resistencia o susceptibilidad a la enfermedad, tanto en este modelo como en humanos. No obstante, estos animales también presentan susceptibilidad a desarrollar otras enfermedades autoinmunes como tiroiditis y sialoadenitis e incluso pueden sufrir neoplasmas a

lo largo de su vida [68], lo que refleja un fallo sistémico en la tolerancia o regulación del sistema inmunitario.

Esta cepa desarrolla insulinitis entre la tercera y cuarta semana de vida, momento en el que los animales se consideran pre-diabéticos. En este estadio, los islotes de Langerhans están infiltrados predominantemente por linfocitos T CD4+, con números bajos de linfocitos T CD8+ y linfocitos B [68]. El debut de la diabetes aparece alrededor de las 10-14 semanas de edad en el ratón NOD, pero puede atrasarse hasta las 30 semanas de edad. Esta característica dificulta la investigación, ya que el inicio de la diabetes no puede predecirse con exactitud. Además, a pesar de tratarse de una cepa congénita, en la que todos los individuos son genéticamente iguales y desarrollan insulinitis, la diabetes es más prevalente en las hembras, con una incidencia del 60 al 90%, mientras que la incidencia en los machos es inferior, entre el 10-30% [69]. Estas diferencias en la incidencia podrían estar causadas por hormonas sexuales, como ha sido ilustrado en distintos estudios en los que han observado un aumento en la incidencia en ratones machos castrados y una disminución en hembras tratadas con andrógenos [70-72]. En la DM1 humana, estas diferencias entre sexos no son significativas, encontrándose incidencias de DM1 similares en ambos sexos [73, 74]. Otra de las principales diferencias entre la patología en el ratón NOD y en humanos es la histopatología de la insulinitis. La agresividad del ataque autoinmune que padecen los islotes de los ratones NOD en el inicio de la enfermedad es mucho mayor que en el páncreas humano. Estos animales presentan un infiltrado masivo, que afecta a todos los islotes y ocasiona una reducción del 90% de la población beta pancreática en el momento del diagnóstico de la enfermedad. Sin embargo, en muestras de donantes con DM1 se ha observado una insulinitis leve al inicio del ataque que afecta a un menor porcentaje de los islotes y que ocasiona una reducción de aproximadamente el 70% de la población beta pancreática en el momento del diagnóstico [68].

### Modelos de inducción química

Actualmente, existen dos compuestos principales para la inducción química de diabetes tipo I: (i) la estreptozotocina (STZ) y (ii) el aloxano (ALX). Ambos compuestos presentan analogía con la estructura de la glucosa y se incorporan a las células beta pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT2. La STZ es un potente agente alquilante genotóxico, que induce roturas en las hebras de ADN [75]. En cambio, el ALX induce la formación intracelular de especies reactivas de oxígeno [75]. Ambos fármacos inducen muerte celular y pueden presentar toxicidad en otros órganos [76].

(i) Administración de STZ

La estreptozotocina (*2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosreido)-D-glucopitynose*), es un compuesto sintetizado por *Streptomyces achromogenes*. La administración en ratones se realiza mediante inyección intraperitoneal o intravenosa. Este fármaco se incorpora en las células beta pancreáticas a través del transportador de glucosa GLUT-2 y provoca la alquilación del ADN, ocasionando la activación de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) que conduce a una depleción de NAD<sup>+</sup>, la disminución del ATP celular y la inhibición de la producción de insulina [75]. Además, la STZ es una fuente de radicales libres que contribuyen al daño ocasionado al ADN, provocando muerte celular [75].

La administración de este fármaco en ratones consigue la inducción de hiperglucemia mediante un mecanismo simple, de bajo coste y controlable. Existen dos protocolos principales para la inducción de hiperglucemia mediante la administración de STZ: la administración de una única dosis de STZ con una concentración alta y la administración de dosis repetidas de STZ a bajas concentraciones. La administración de una única dosis alta se realiza mediante la inyección de una concentración de 100 a 200 mg·kg<sup>-1</sup> en ratones, lo que ocasiona una muerte agresiva de la población beta pancreática e hiperglucemia. La administración múltiple se realiza habitualmente durante cinco días consecutivos mediante la inyección de una dosis entre 20 y 40 mg·kg<sup>-1</sup> al día de STZ. Mediante este proceso, se consigue un daño inicial de las células beta que induce un proceso inflamatorio en el que participan activamente los macrófagos [76]. En este caso, el desarrollo de la diabetes depende de la producción de citoquinas y la diabetes se desarrolla incluso sin la presencia de linfocitos T y B. Por ello, a pesar de presentar un proceso inflamatorio, este modelo no mimetiza la patología humana.

(ii) Administración de aloxano

El aloxano (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) es un compuesto que se incorpora rápidamente a las células beta pancreáticas tras su administración. Su efecto diabetogénico se atribuye a la formación de radicales libres. Una vez se encuentra en el interior celular, el aloxano se reduce a ácido dialúrico y se re-oxidiza de nuevo a aloxano, creando un ciclo redox que genera radicales superóxido. Este ciclo finalmente ocasiona la fragmentación del ADN, induciendo la muerte de las células beta pancreáticas [75]. En ratones se emplea una dosis de 50 a 200 mg·kg<sup>-1</sup>, dependiendo de la vía de administración.



### Modelo de DM1 inducido por patógenos: ratón RIP-LCMV

Como se ha mencionado anteriormente, la infección de algunos virus como los enterovirus o rotavirus se ha asociado con la DM1 [35]. Esta asociación se ha basado en la detección de ARN enteroviral en el suero de pacientes y en la correlación entre el incremento de anticuerpos anti-rotavirus en el suero de niños con riesgo de padecer DM1 y la aparición de auto-anticuerpos contra las células beta pancreáticas [35, 77]. Estas infecciones virales pueden inducir directamente la lisis de las células beta, la activación de linfocitos T auto-reactivos contra este tipo celular, la pérdida de células T reguladoras (Tregs) o incluso mimetismo molecular [36]. Debido a estas características, se han empleado virus para inducir la destrucción de la población beta pancreática en modelos animales. El más empleado en la investigación de DM1 es el ratón RIP-LCMV. Este ratón expresa antígenos del virus *Lymphocytic Choriomeningitis* (LCMV) en las células beta pancreáticas bajo el promotor de insulina de rata (RIP) [78]. De forma espontánea, este modelo no desarrolla ningún signo de destrucción de las células beta, pero al infectar los ratones con el LCMV, se activa la respuesta del sistema inmune contra los antígenos virales, que también se encuentran en las células beta. Esto induce la ablación selectiva de las células beta pancreáticas [78]. Sin embargo, la eficacia del modelo depende de los niveles de replicación del virus y del tiempo en el que se realiza la infección, por lo que la reproducibilidad de los resultados obtenidos puede variar.

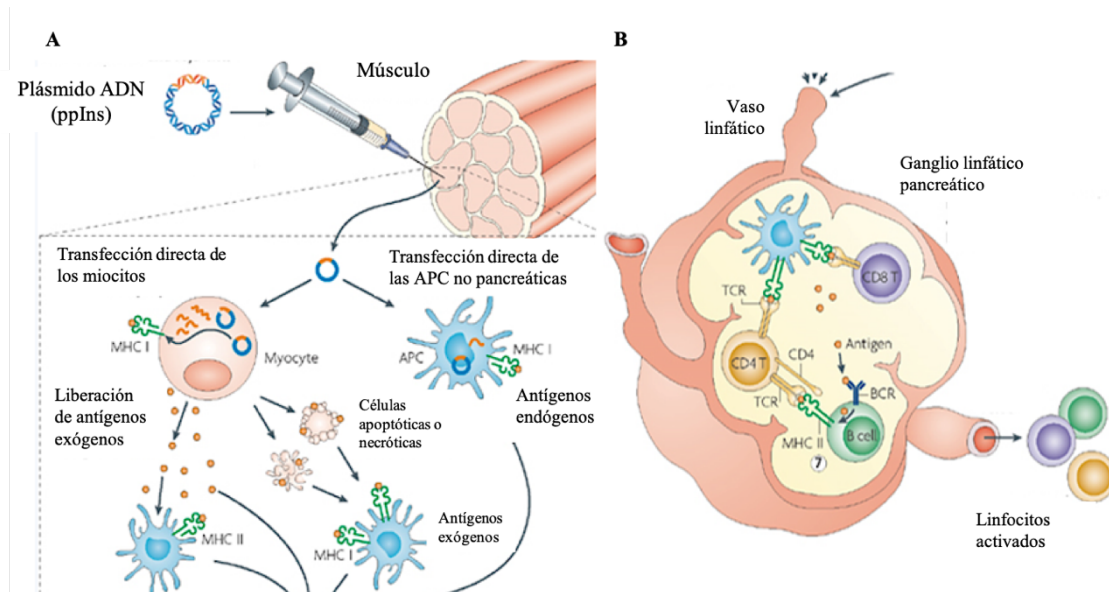
### Modelo de DM1 inducible por vacunación de ADN: ratón RIP-B7.1

El modelo transgénico de DM1 inducible RIP-B7.1 expresa la molécula co-estimuladora del sistema inmune B7.1 (CD80) en las células beta pancreáticas bajo el promotor RIP [79]. La molécula B7.1 o CD80 está expresada normalmente en las células presentadoras de antígenos y su expresión en las células beta aumenta la susceptibilidad a desarrollar diabetes tras la estimulación adecuada [80]. Este ratón es el primer modelo capaz de desarrollar DM1 tras la inmunización con una vacuna de ADN que contiene el ADN de un reconocido auto-antígeno, la preproinsulina (Ppins) [79]. Para evitar el desarrollo espontáneo de diabetes, el haplotipo del complejo de histocompatibilidad 2 murino (H-2) de este modelo debe ser H-2<sup>b</sup> o H-2<sup>d</sup>. La importancia en la elección del haplotipo reside en su influencia en la susceptibilidad de padecer algunas enfermedades autoinmunes como tiroiditis o diabetes en animales no inmunizados [81]. El tratamiento con auto-antígenos específicos de la célula beta no es patogénico en cepas murinas con haplotipo H-2<sup>b</sup> o H-2<sup>d</sup>, ya que estos haplotipos no confieren susceptibilidad a desarrollar la enfermedad [81, 82]. El desarrollo espontáneo de diabetes en ratones RIP-B7.1 con haplotipo H-2<sup>b</sup> o H-2<sup>d</sup> es poco frecuente y la diabetes puede ser inducida mediante la inmunización de los animales con autoantígenos de las células beta pancreáticas que estimulan



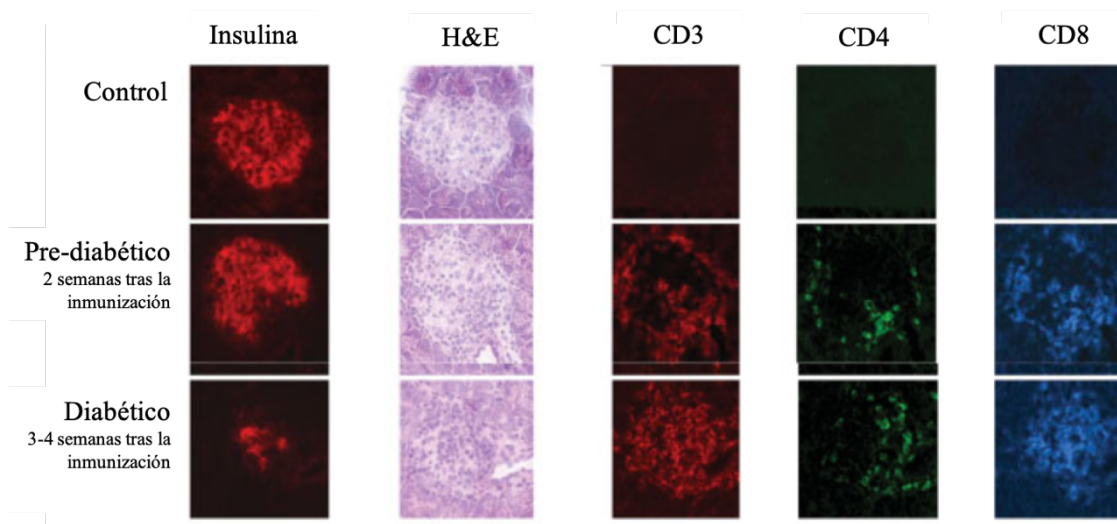
la autoinmunidad contra este tipo celular. Por ejemplo, la administración del gen que codifica la insulina en forma de vacuna de ADN en ratones RIP-B7.1 es capaz de inducir la enfermedad [82, 83], así como la inmunización con el ADN de la preproinsulina II murina [82].

Los mecanismos mediante los que el transgén RIP-B7.1 contribuye al desarrollo de la diabetes tras la administración de un autoantígeno no son del todo conocidos, pero podrían implicar la amplificación de la respuesta de los linfocitos T si las células beta presentan auto-antígenos en presencia de una co-estimulación apropiada [84]. La inmunización con el ADN de la preproinsulina II murina ha sido descrita como inductora de insulinitis con presencia de linfocitos T CD4+ y CD8+ y diabetes con una gran incidencia en ratones RIP-B7.1 (H-2<sup>b</sup>) [82]. El desarrollo de diabetes observado en los ratones RIP-B7.1 (H-2<sup>b</sup>) tras la inmunización con el ADN de la preproinsulina-II en forma plasmídica, es consistente con el perfil pro-inflamatorio de la respuesta inmunológica que suelen provocar las vacunas de ADN al inyectarse en el tejido muscular [82]. El efecto de la vacunación con ADN en el músculo ha sido ampliamente descrito [85], pudiéndose hipotetizar cómo ocurre el desarrollo de la diabetes autoinmune experimental en el ratón RIP-B7.1 tras la incorporación del plásmido al tejido muscular (**Fig. 4**). Las vacunas de ADN son una forma eficiente de generar inmunidad tanto celular como humoral mediante la presentación de antígenos codificados por plásmidos e incorporados por las células musculares [85]. En primer lugar, los miocitos transfectados con el plásmido expresarían el gen de la preproinsulina, liberando de esta forma los autoantígenos codificados por el plásmido. No se conocen exactamente que formas peptídicas de la preproinsulina son las que generan la respuesta inmune. Tras la liberación de los antígenos, estos serían incorporados por las células presentadoras de antígenos (APC) periféricas, que a su vez también pueden ser transfectadas por el plásmido tras la inmunización. De este modo, se consigue la presentación de los antígenos tanto por el complejo de histocompatibilidad de clase I como de clase II, activando así la respuesta de los linfocitos T CD8+ y CD4+, respectivamente, en los ganglios linfáticos y posiblemente en los nódulos pancreáticos. Los linfocitos T activados se expandirían, creando una población de linfocitos T autorreactivos contra un antígeno derivado de la vacuna de ADN [85], que sería propio de las células beta pancreáticas. Además, la activación de células CD4+ inicia respuestas adaptativas y humorales como la activación de los linfocitos B, que en este caso secretarían autoanticuerpos específicos contra el autoantígeno generado mediante la vacunación.



**Figura 4.** Mecanismo de inducción de inmunidad celular y humoral de las vacunas de ADN. **A.** Presentación antigénica en el lugar de la inmunización. Tras la inyección del plásmido que contiene el gen de la preproinsulina (ppIns), los miocitos y las células presentadoras de antígenos (APC) transfectadas presentan los productos derivados de la expresión de la ppIns a través del complejo molecular de histocompatibilidad de clase I (MHC-I). Además, las APC captan y presentan a través del complejo molecular de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) antígenos exógenos liberados por los miocitos. **B.** Presentación antigénica en el ganglio linfático y activación de los linfocitos. La presentación de los antígenos derivados de la expresión de la ppIns por parte de las APC en los ganglios linfáticos consigue la activación de los linfocitos T CD4 y CD8+, mediante la comunicación celular a través de los receptores de los linfocitos T (TCR) y B (BCR). Modificado de [85].

El modelo de desarrollo de diabetes en los ratones RIP-B7.1 evoluciona a través de dos etapas. En primer lugar, la respuesta de los linfocitos T autorreactivos es inducida mediante una sola inyección de la vacuna de ADN. Seguidamente, la invasión progresiva de los linfocitos autorreactivos en los islotes conduce a la etapa efectora de la respuesta autoinmune, provocando la destrucción de las células beta pancreáticas [79]. El desarrollo de la diabetes en este modelo ocurre en un rango de 3-4 semanas tras la vacunación en el 60-95% de los animales inmunizados [79]. Alrededor de dos semanas tras la inmunización, los ratones inmunizados comienzan a presentar un grado leve de insulinitis o infiltrado linfocitario en los islotes de Langerhans [80] (**Fig. 5**). Entre tres y cuatro semanas tras la inmunización, los islotes presentan una extensa infiltración de linfocitos T CD4+ y CD8+, una significativa reducción de la expresión de insulina, hiperglucemia y, por tanto, diabetes [80] (**Fig. 5**). El desarrollo de diabetes ocurre con la misma incidencia en ratones machos y hembras. Además, mediante la presencia de un solo alelo del gen B7.1 en las células beta se consigue el desarrollo de la diabetes, pudiéndose emplear de esta forma animales heterocigotos u homocigotos, machos y hembras para la experimentación [79]. La inmunización con ppIns induce diabetes en prácticamente todos los animales RIP-B.1, con un periodo de tiempo, histopatología y sintomatología similares [79], haciendo de este modelo una excelente herramienta para la investigación en diabetes.



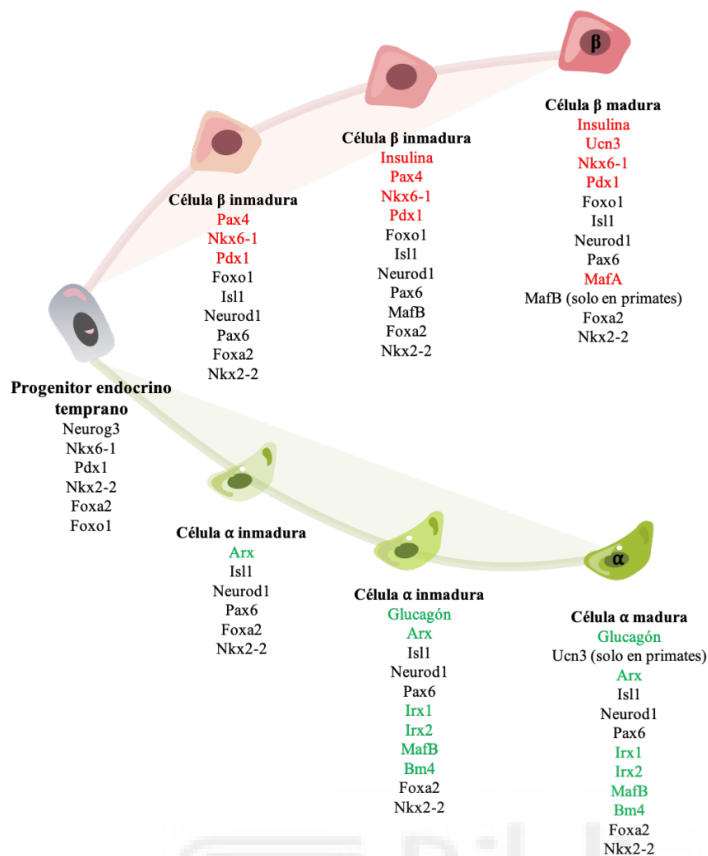
**Figura 5.** Características del infiltrado linfocitario en islotes de ratones RIP-B7.1 sin inmunizar (control), dos semanas tras la inmunización (pre-diabético) y tres-cuatro semanas tras la inmunización (diabético). Los linfocitos T CD3+ (rojo), CD4+ (verde) y CD8+ (azul) se observan tras la inmunización, con una mayor proporción de CD8+. Adaptada de [80].

### I.3. Dinámica de la masa y plasticidad de los islotes de Langerhans

Además de su función secretora, una de las características más relevantes de las células del islote de Langerhans es su capacidad innata para adaptarse a distintos estados fisiológicos con diferentes requerimientos metabólicos [86]. Dicha capacidad de adaptación está basada principalmente en la modulación de la masa celular, así como la función, y es de gran importancia para el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa en distintas etapas vitales. Además, investigaciones recientes han demostrado que las células del islote de Langerhans presentan plasticidad en cuanto a su capacidad de cambiar su identidad [62, 87]. A lo largo de este apartado se revisarán los eventos que modulan el balance de la masa de las células endocrinas del páncreas y su plasticidad.

La masa de las células del islote de Langerhans está sometida a una regulación dinámica por la acción de distintos nutrientes, por la activación de rutas de señalización de factores de crecimiento o por la activación de modificaciones post-traduccionales de diversos genes, entre otros factores [86]. Esta regulación consigue mantener un balance neutro entre la regeneración celular y la muerte celular. No obstante, los mecanismos mediante los que se obtiene dicho balance neutro y el mantenimiento de las células pancreáticas no son del todo conocidos en humanos. Estudios en modelos animales han revelado fundamentalmente cuatro mecanismos potenciales: replicación o proliferación de células endocrinas maduras existentes, muerte celular programada de células existentes, cambios en el tamaño celular y, en menor medida,

diferenciación o neogénesis a partir de células precursoras del epitelio ductal [86]. Las células del islote presentan una gran capacidad de regeneración, cuyo mecanismo parece ser estímulo-dependiente, fisiológico (por ejemplo, en el embarazo) o compensatorio tras un reto metabólico (obesidad) o un daño (ligación ductal, ablación de las células beta, pancreatectomía parcial). En condiciones fisiológicas, la masa del islote es relativamente estable. Las células del islote se encuentran bajo un estado de renovación lenta, con niveles bajos de proliferación o apoptosis [86]. Recientemente, mediante la ablación extrema de la población beta pancreática [87] se ha evidenciado la existencia de procesos de transdiferenciación de células alfa a beta como un nuevo mecanismo de regeneración de células beta pancreáticas, que parece implicar cambios en los factores de transcripción que definen la identidad celular. Las células alfa y beta maduras provienen de un ancestro común y comparten varios factores de transcripción en su especificación (**Fig. 6**) [88]. La especificación de ambos tipos celulares está coordinada por una red compleja de factores de transcripción que establece y mantiene la identidad en las células diferenciadas. Durante los estadios tardíos de la diferenciación de las células beta, los factores de transcripción de la familia de oncogenes *v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma*, MAFB y MAFA, tienen una función importante. La expresión de MAFB en células beta precede a un incremento en la expresión de *Pancreatic duodenal homeobox 1* (PDX1), que marca el inicio de la transcripción de insulina. La expresión de MAFA comienza tras el inicio de la transcripción de insulina y persiste en las células beta maduras. En la especificación de la identidad de la célula beta, la transcripción de insulina es iniciada y mantenida por los factores de transcripción PDX1, *Neuronal differentiation 1* (NEUROD1), *Paired box 6* (PAX6) y MAFA [88]. De forma adicional, *Paired box gene 4* (PAX4), hasta su pérdida de expresión en el adulto, *NK6 Homeobox 1* (NKX6-1) y PDX1 inhiben la expresión de glucagón, previniendo la expresión de esta hormona en las células beta. Entre los factores de transcripción que definen la identidad de la célula alfa pancreática se encuentra *Aristaless related homeobox* (ARX). Este factor de transcripción se requiere para el desarrollo de las células alfa y el mantenimiento de su masa [88]. Además de su papel en la transcripción de la insulina, PAX6 también coordina la transcripción del gen que codifica el glucagón en la célula alfa, directamente mediante su unión al promotor del gen y de forma indirecta induciendo la expresión de otros factores de transcripción como MAFB y NEUROD1, que también activan la expresión del glucagón [88]. Por tanto, la diferenciación apropiada de cada tipo celular es un proceso complejo que requiere cambios dinámicos en los niveles de expresión de distintos factores de transcripción siguiendo una secuencia determinada (**Fig. 6**).



**Figura 6.** El desarrollo y mantenimiento de la identidad de células alfa y beta desde un progenitor común requiere una red de expresión de factores de transcripción. Los factores de transcripción y hormonas específicos en células beta (rojo) y alfa (verde) están indicados. A pesar de su función opuesta en la regulación de la glucosa, las células alfa y beta maduras comparten la expresión de varios factores de transcripción (negro). Adaptada de [88].

## Proliferación

La mayor parte de las evidencias acerca de la proliferación de las células del islote de Langerhans ha sido proporcionada a partir de estudios en modelos animales. En el ratón, las células beta preexistentes son la mayor fuente de nuevas células beta durante la vida adulta del ratón [89]. No obstante, la función y la proliferación de las células del islote en el ratón disminuye con la edad [90, 91]. En modelos de adaptación a situaciones de resistencia a la insulina como el embarazo y la obesidad, las células beta proliferan en respuesta a la demanda creciente de insulina a la que se ven sometidas [92-94]. De la misma forma, la proliferación de las células beta supervivientes tiene un papel importante en la regeneración de este tipo celular en roedores sometidos a ligación ductal, pancreatectomía parcial y ablación de la población beta pancreática en modelos murinos transgénicos [95-97]. A pesar de que la regeneración de la población beta pancreática en adultos a través de la replicación ha sido estudiada de forma extensa, existe poca información acerca de la regeneración de las células no-beta del islote. Las células alfa pancreáticas sufren una disminución en su tasa de proliferación en ratones obesos sometidos a dieta alta en grasa durante doce semanas [98]. Otros estudios realizados en ratones obesos han revelado una asociación positiva entre la interleuquina 6 (IL-6) y la proliferación de la célula alfa pancreática [99]. De forma reciente, se ha evidenciado que las células alfa y delta proliferan tras la destrucción de la población beta pancreática mediante la administración de

estreptozotocina [100]. Además, se ha descrito un aumento de proliferación de células alfa en modelos de ligación del ducto pancreático junto con destrucción de las células beta pre-existentes mediante la administración de ALX [101].

En humanos, la masa de las células beta puede expandirse desde el nacimiento hasta la etapa adulta, pero la proliferación de las células del islote es muy baja en adultos [102], y disminuye al 3% seis meses tras el nacimiento [46]. Al igual que en roedores, la función de las células beta y su tasa de proliferación también disminuyen con la edad [91, 103]. La mayoría de los estudios en islotes humanos en condiciones de adaptación a situaciones de resistencia a la insulina como el embarazo y la obesidad están basados en estudios histológicos de tejido pancreático de donantes. Distintas investigaciones han mostrado valores bajos de proliferación de células beta pancreáticas, sin cambios durante el embarazo o sin incremento en sujetos diabéticos [104, 105]. Por otro lado, Butler y colaboradores, describieron un aumento de la masa de la célula beta durante el embarazo [105] y sugirieron la existencia de un aumento adaptativo de la masa de este tipo celular que podría estar llevado a cabo por diferenciación a partir de progenitores celulares en vez de por proliferación de células beta pre-existentes.

#### Neogénesis de células endocrinas a partir del epitelio ductal

El papel del epitelio ductal como fuente de formación de nuevas células del islote permanece como una hipótesis controvertida. Mientras que esta forma de renovación celular tiene lugar durante la embriogénesis [86], el papel de la neogénesis en la modulación de la masa de las células endocrinas en condiciones fisiológicas en el ratón adulto no es del todo conocido. Existen evidencias de diferenciación *in vivo* de células exocrinas en modelos de ligación del ducto pancreático, en los que se ha observado un incremento de células beta y pequeñas agrupaciones de células endocrinas cerca o pertenecientes al epitelio ductal [106]. Recientemente, se ha confirmado que células positivas para el factor de transcripción neurogenina 3 (Ngn3) en el epitelio ductal contribuyen a la neogénesis de células beta tras la ligación ductal [96, 107]. No obstante, existen estudios que sostienen que la neogénesis de islotes tras pancreatectomía parcial en roedores parece estar ligada tanto a neogénesis como a proliferación [108, 109], mientras que otras investigaciones independientes sostienen que la proliferación es el único evento regenerativo que tiene lugar [89, 97]. Tras la ablación extrema de la población beta pancreática mediante la administración de aloxano se ha descrito un aumento de células insulino-positivas en los ductos [110], sugiriendo la existencia de un proceso de neogénesis. Estudios en páncreas humanos han mostrado un rango de 0 a 2.2% de células positivas para insulina presentes en el epitelio ductal en individuos con menos de 7 años y un rango de 0 a 1.2% tras los 7 años de vida, proponiendo una disminución de la tasa de neogénesis con la edad [102, 111]. Además, se ha descrito un aumento de células insulino-



positivas en los ductos durante el embarazo (0.4% en el grupo control frente a un 1.2% en el grupo de embarazo) y en individuos obesos (0.4% en el grupo control frente a un 0.8% en el grupo obeso)[104, 105]. En cambio, se sabe muy poco de este proceso en el caso de la célula alfa pancreática.

### Apoptosis

La apoptosis supone una serie de eventos coordinados para la programación de la muerte celular y tiene una función relevante en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Durante el periodo neonatal en humanos existe un aumento de la masa de la célula beta, seguido por un aumento de muerte celular [46]. En adultos, el estudio sistemático de páncreas de donantes de distintas edades sugiere que la apoptosis de las células beta es baja y permanece constante a lo largo de la vida [112]. La pérdida progresiva de la masa funcional de células beta en diabetes se considera la consecuencia del desbalance entre las tasas de proliferación y/o neogénesis y del porcentaje de células apoptóticas. En individuos diabéticos y obesos, la tasa de apoptosis en células beta está aumentada [104, 113]. La apoptosis en este tipo celular puede inducirse en respuesta a distintos daños que actúan al menos a través de tres vías: muerte celular inducida por citoquinas y mediada por receptores [114], disrupción mitocondrial en respuesta a radicales libres de oxígeno [115], y activación de vías de señalización intracelular asociadas al estrés del retículo endoplásmico (RE) que conducen a la apoptosis [116]. Las células beta humanas son vulnerables a dichos mecanismos y en la DM2 éstos pueden ser activados por alteraciones metabólicas como altos niveles de glucemia (glucotoxicidad) y de ácidos grasos libres (lipotoxicidad).

El aumento progresivo de la glucemia que tiene lugar en la diabetes causa fallos en la función de las células beta y la sensibilidad a la insulina, en un proceso conocido como glucotoxicidad [117]. El aumento en el metabolismo de la glucosa en las células beta conduce a una mayor generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, aumentando el estrés oxidativo. Las células beta humanas son especialmente sensibles al estrés oxidativo debido a una baja expresión y actividad de enzimas antioxidantes [118]. Adicionalmente, las citoquinas también son mediadoras de la glucotoxicidad en DM2 [119, 120] y el papel de estas moléculas en la fisiopatología de la DM1 está ampliamente reconocido [121, 122]. La apoptosis activada en condiciones de glucotoxicidad en presencia de citoquinas involucra vías de señalización mediadas por el aumento de la expresión del receptor de muerte Fas (CD95) y la activación de la caspasa 8, entre otras rutas. La regulación al alza del receptor Fas por altos niveles de glucemia puede contribuir a la destrucción de las células beta a través de la expresión constitutiva de FasL, independientemente de la presencia de una reacción inmunológica, lo que proporciona un mecanismo común de muerte celular en DM2 y DM1 [123, 124]. La

hiperglucemia persistente conduce a la estimulación crónica de las células beta y la síntesis de insulina, lo que puede producir estrés en el retículo endoplásmico (RE) [125]. El RE es el responsable de la síntesis, modificación y conducción de las proteínas a sus sitios diana. Estos procesos pueden verse alterados bajo varias condiciones fisiológicas y patológicas, produciendo estrés en el retículo que puede iniciar apoptosis [116]. La exposición a altos niveles de glucemia causa un gran aumento de marcadores de estrés del RE en islotes de donantes con DM2 [126]. Además, la lipotoxicidad, que se encuentra ligada a la presencia de glucotoxicidad, está asociada a un aumento de apoptosis en islotes humanos [127]. A pesar de que todos los tipos celulares del islote están sometidos al mismo ambiente que las células beta, existe una falta de información acerca de los mecanismos de apoptosis de la célula alfa en condiciones fisiológicas, patológicas y experimentales.

#### Dediferenciación y transdiferenciación celular

La de-diferenciación de una célula está determinada o bien por la regresión a un estadio anterior en la diferenciación o por la pérdida de su fenotipo y marcadores de identidad [128]. Estudios en roedores y humanos han indicado que la de-diferenciación de la célula beta se manifiesta como una reducción en la expresión de genes enriquecidos en la población beta pancreática, una pérdida progresiva de factores de transcripción específicos de la célula beta, como PDX1, MAFA y FOXO1, y la reaparición de marcadores específicos de progenitores endocrinos, como *neurogenin 3* (NGN3) [128]. Estas alteraciones provocan alteraciones estructurales y metabólicas en las células beta que ocasionan disfunción en la secreción de insulina estimulada por glucosa, haciendo que la de-diferenciación sea considerada un factor de pérdida de células beta funcionales en DM1 y DM2 [128]. Es desconocido si las células beta de-diferenciadas pueden volver a un estado de célula beta madura, si persisten en el páncreas como células de-diferenciadas con una grave disminución en la habilidad para secretar insulina o si la muerte celular es inevitable para estas células [128].

La transdiferenciación celular se define como un cambio de identidad en células diferenciadas que ocurre mediante la regulación a la baja del programa genético específico de un tipo celular y la regulación al alza del programa genético de otro tipo celular, sin atravesar un estado de pluripotencia. Estos dos procesos pueden tener lugar de forma simultánea, en el que las células intermediarias expresan marcadores de dos tipos celulares distintos, o secuencial, con la aparición de células de-diferenciadas [129-131].

Estudios recientes han revelado nuevos mecanismos potenciales de regeneración de las células endocrinas mediante transdiferenciación celular [62, 87, 132]. En estos estudios se ha demostrado la capacidad de conversión directa o indirecta de células endocrinas diferenciadas en células beta pancreáticas, en modelos murinos de ablación de la población beta pancreática y



en células del islote humanas. A pesar de que estos procesos no pueden determinarse con exactitud en humanos, el páncreas de pacientes diabéticos presenta un aumento de células bi-hormonales, que podría indicar tanto de-diferenciación celular o un intento de regenerar nuevas células beta a través de la conversión de células alfa o delta en beta [128, 133-135]. La contribución de estos procesos a la dinámica de la masa de las células no-beta del islote será ampliamente debatida durante la discusión de la presente tesis doctoral.

#### **I.4. Fisiopatología de la célula alfa pancreática en la DM1**

La hiperglucagonemia y la secreción desregulada del glucagón han sido relacionadas como factores que contribuyen a la hiperglucemia en pacientes con Diabetes Mellitus tipo I [136, 137] y tipo II [138, 139]. A pesar de que esta observación tiene un gran soporte actualmente, de forma histórica la hiperglucemia siempre ha sido asociada a la falta de insulina. En este apartado, revisaremos los eventos que condujeron a la creencia actual de la participación de ambas hormonas en la hiperglucemia diabética. Además, se abordarán las alteraciones funcionales que sufre la célula alfa pancreática en la DM1.

Como se ha mencionado en apartados anteriores, la principal característica de la DM1 es la destrucción autoinmune de la población beta pancreática. Las demás células del islote, como la célula alfa, sobreviven al ataque autoinmune, ya que no está dirigido contra ellas. No obstante, las células no-beta del islote pueden sufrir los cambios en el control paracrino debido a la ausencia o reducción de insulina, el ambiente inflamatorio del islote y la hiperglucemia, entre otros factores, que podrían afectar a la función de estos tipos celulares. Los pacientes de DM1 sufren defectos en la secreción del glucagón, principalmente en estadios tempranos de la enfermedad. En esta patología, los niveles de glucagón plasmático se encuentran elevados en condiciones de alta glucemia [140-144], momento en el que se esperaría una supresión de la secreción del glucagón por el efecto directo de la glucosa en la célula alfa [17]. La contribución del glucagón a la hiperglucemia ha sido ampliamente discutida, como se detallará a continuación.

En 1975, Unger y Orci propusieron que la hiperglucemia en los pacientes diabéticos estaba asociada a una secreción inapropiada del glucagón por parte de las células alfa pancreáticas y no simplemente como consecuencia de la falta de insulina *per se* [145]. Esta propuesta causó entonces un gran debate, particularmente en el caso de la fisiopatología de la DM1. El dogma existente relacionaba la hiperglucemia únicamente con la falta de insulina causada por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. Esta creencia estaba basada principalmente en estudios realizados en pacientes con bajos niveles de secreción de insulina y

cetoacidosis diabética, en los que esta condición se contrarrestaba mediante la administración de insulina exógena. En 1977, Barnes y colaboradores estudiaron el desarrollo de cetoacidosis diabética en pacientes con pancreatectomía. En estos pacientes no detectaron glucagón plasmático, concluyendo que esta hormona no tiene un papel esencial en el desarrollo de esta condición diabética [146]. No obstante, durante la misma época, varias investigaciones detectaron la producción de glucagón extra-pancreático en animales de experimentación [147] y células positivas para glucagón en el tejido estomacal de humanos [148]. Estos estudios proporcionaron evidencias y dieron soporte a un papel del glucagón como contribuyente a la hiperglucemia. Además, estudios más recientes en pacientes con pancreatectomía han demostrado la existencia de secreción de glucagón por parte de células del tracto gastrointestinal [149].

Las evidencias acerca de un posible papel del glucagón como factor hiperglucemiante en la diabetes causaron un interés creciente en el desarrollo de antagonistas de la acción del glucagón. En 1996, Brand y colaboradores consiguieron la normalización de los niveles de glucosa en conejos diabéticos tratados con aloxano, mediante la administración de un anticuerpo monoclonal de alta afinidad contra el glucagón, capaz de neutralizar la actividad del glucagón circulante [150]. Este mismo anticuerpo fue empleado con éxito por el mismo grupo en ratas tratadas con STZ con diabetes moderada, sin efecto en los animales con diabetes severa [151], indicando que mediante la neutralización del glucagón se consigue normoglucemia en presencia de unos niveles mínimos de insulina. Estos estudios incentivaron la búsqueda y el desarrollo de nuevas formas de antagonizar la acción del glucagón. El modelo experimental de noqueo (KO) del receptor de glucagón (Gcgr),  $Gcgr^{-/-}$ , surgió entonces para la caracterización del efecto del glucagón en el control de la glucemia [152, 153]. Estos animales mostraron, en comparación con controles, bajos niveles de glucemia, una mayor tolerancia a la glucosa y niveles similares de insulina plasmática [152, 153]. En 2011, Lee y colaboradores administraron repetidas dosis de STZ al ratón  $Gcgr^{-/-}$ , sin observar desarrollo de diabetes [154]. Este resultado indicó un importante papel de la señalización del glucagón en la hiperglucemia diabética. Posteriormente, el mismo grupo de investigación reconstituyó los receptores de glucagón en el hígado del ratón  $Gcgr^{-/-}$  mediante la liberación guiada del gen por adenovirus [155]. Al administrar STZ, los ratones  $Gcgr^{-/-}$  con expresión del receptor de glucagón en el hígado desarrollaron diabetes [155]. No obstante, la ablación casi total de la población alfa pancreática en ratones, y la consecuente deficiencia severa de glucagón, no previene la hiperglucemia tras la administración de STZ [156]. En este estudio, Thorel y colaboradores concluyeron que la presencia de niveles mínimos de glucagón es capaz de mantener la función metabólica de esta hormona y el fenotipo diabético tras la administración del fármaco diabetogénico [156]. Investigaciones posteriores con otros modelos de depleción de células alfa, inmunoneutralización del glucagón o

administración de antagonistas del receptor de glucagón tampoco observaron una mejora en el fenotipo diabético tras la administración de STZ [157]. Las diferencias observadas en estos estudios podrían ser causadas por una destrucción incompleta de la población beta pancreática mediante el uso de STZ, que ocasionaría niveles mínimos de insulina plasmática. En 2016, Damond y colaboradores emplearon un mecanismo de ablación casi completa de la población beta pancreática en ratones  $Gcgr^{-/-}$ , inducible mediante la administración de difterotoxina [158]. En este caso, tras la ablación casi completa de la población beta pancreática, los ratones  $Gcgr^{-/-}$  desarrollaron diabetes [158]. Por tanto, el grado de insuficiencia de insulina podría ser importante para determinar la contribución del glucagón a la hiperglucagonemia en los ratones  $Gcgr^{-/-}$ .

En pacientes con estadios tempranos de diabetes tipo I, en los que puede haber niveles residuales de insulina, la secreción inapropiada de glucagón podría ser responsable de la producción de glucosa hepática que contribuiría a la hiperglucemia, y una normalización de la glucemia podría ser alcanzada si se previene de forma terapéutica la acción del glucagón. En este contexto, varias líneas de investigación tienen como diana a la célula alfa pancreática para el desarrollo de potenciales estrategias terapéuticas en la diabetes. El desarrollo de antagonistas, anticuerpos monoclonales u oligonucleótidos anti-sentido para el receptor de glucagón han sido ensayados preclínicamente y clínicamente con el objetivo de limitar la acción del glucagón en el hígado y así reducir la hiperglucemia en la diabetes mediante la reducción de la producción de glucosa hepática [159]. Concretamente, en DM1, el uso del anticuerpo contra el receptor de glucagón “REMD-477”, ha conseguido una disminución de los requerimientos de insulina para el control de la glucemia, así como una mejora del control de la misma [160].

Además de la contribución a la hiperglucemia, la secreción anormal del glucagón también tiene una gran importancia en el tratamiento de la DM1 a la hora de controlar los niveles de glucemia y de prevenir episodios de hipoglucemia. La respuesta secretora de las células alfa a concentraciones estimuladoras bajas de glucosa plasmática está deteriorada en la DM1 [161-163]. En estos pacientes insulino-dependientes, esta desregulación ocasiona un alto riesgo de sufrir episodios graves de hipoglucemia [162]. Una posible causa de este fallo en la secreción de glucagón reside en alteraciones del sistema nervioso en la regulación de la secreción de glucagón durante la DM1 [164]. Los islotes de Langerhans presentan una gran inervación por neuronas parasimpáticas, simpáticas y sensoriales [165], cuyas terminaciones nerviosas liberan neurotransmisores con un papel importante en la secreción hormonal de las células del islote [165-167]. De forma fisiológica, la regulación autonómica de la secreción de estas hormonas contribuye principalmente a la respuesta al estrés metabólico o físico para proteger al cerebro de daños asociados a la hipoglucemia [168, 169]. En 1977 se describió cómo en estadios tempranos de DM1, el sistema nervioso autónomo es estimulado proporcionando una correcta

respuesta contrarreguladora para prevenir la hipoglucemia [170]. Sin embargo, no todos los pacientes con DM1 poseen un sistema nervioso autónomo efectivo para reaccionar frente a una posible hipoglucemia causada por la disfunción de la secreción del islote [170]. Esta disfunción ha sido asociada en parte a la observación de una pérdida de la inervación en los islotes de Langerhans [171], que ocasionaría una desregulación de la respuesta de las células alfa a condiciones de hipoglucemia [164]. Esta pérdida de inervación también ha sido descrita en modelos de diabetes autoinmune espontánea [172, 173] y modelos murinos de diabetes autoinmune experimental [174].

En conclusión, la célula alfa pancreática presenta una grave desregulación de su función secretora en la DM1. Por un lado, la falta de supresión de la secreción de glucagón en condiciones de alta glucemia, conduce hacia una exacerbación de la hiperglucemia mediante la producción y liberación de glucosa hepática. La hiperglucemia crónica induce daños glucotóxicos a varios tejidos, promoviendo neuropatías, retinopatías y complicaciones cardiovasculares. En cambio, en condiciones hipoglucemiantes, la secreción de glucagón no se ve estimulada, probablemente por una ausencia de respuesta del sistema nervioso autónomo, lo que produce un alto riesgo de sufrir episodios graves de hipoglucemia en los pacientes con DM1. El conjunto de mecanismos que producen estas alteraciones no es del todo conocido y requieren mayor investigación para un mayor conocimiento de la fisiopatología de la célula alfa pancreática en la DM1. El estudio de la masa de este tipo celular podría esclarecer parte de estas alteraciones y ha sido el objeto de estudio de la presente tesis doctoral, discutiéndose de forma detallada mediante la descripción de los resultados obtenidos y su discusión.



Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

## **II. OBJETIVOS**



## II. OBJETIVOS

La investigación en diabetes tipo I se ha centrado en la fisiopatología de la célula beta pancreática y en el estudio del ataque autoinmune contra este tipo celular, con el fin de comprender la etiología de la enfermedad y crear estrategias para conseguir la supervivencia de las células beta pancreáticas. No obstante, las células alfa pancreáticas también tienen un papel fundamental en la fisiopatología de la diabetes tipo I. Diversos trabajos han puesto de manifiesto que las alteraciones en la masa y la función de la célula alfa pancreática y la secreción de glucagón pueden contribuir a la hiperglucemia y otros desórdenes metabólicos en esta patología. Además, estudios recientes evidencian que este tipo celular constituye una fuente potencial para la regeneración de células beta pancreáticas en modelos murinos de ablación de esta población. La transdiferenciación de células alfa en células beta pancreáticas supone un nuevo mecanismo de regeneración de los islotes de Langerhans. Los cambios en la masa de la célula alfa pueden jugar un papel fundamental en esta nueva característica. Sin embargo, se conoce poco acerca de los procesos que modulan la masa de la célula alfa pancreática en esta patología. El conocimiento de los eventos que tienen lugar sobre la dinámica de la masa de la célula alfa en la diabetes tipo I puede aportar información valiosa para poder modular la misma en dirección a estrategias terapéuticas.

Por ello, el objetivo de la presente tesis es la caracterización de la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en la diabetes tipo I. Para ello, se ha empleado el modelo murino de diabetes autoinmune experimental (EAD), RIP-B7.1, con el fin de desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- 1- Analizar los cambios que se producen en la masa de la célula alfa pancreática tanto en un estadio temprano como avanzado de un modelo de diabetes autoinmune experimental.
- 2- Estudiar los procesos reguladores que modulan la masa de la célula alfa pancreática en ambos estadios de la diabetes autoinmune experimental.
- 3- Evaluar la posible presencia de procesos relacionados con la transdiferenciación celular y su implicación en el balance de la masa de la célula alfa pancreática durante el desarrollo de la diabetes autoinmune experimental.





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**





### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **III.1. Modelo animal e inducción de la destrucción de las células beta pancreáticas.**

El modelo murino transgénico de diabetes autoinmune experimental (EAD), RIP-B7.1 (H-2<sup>b</sup>) C57BL/6J, expresa la molécula co-estimuladora del sistema inmune, B7.1 (CD80) bajo el control del promotor de insulina de rata (RIP) en las células beta pancreáticas. Gracias a la expresión de la molécula B7.1 en las células beta pancreáticas se consigue incrementar la susceptibilidad de las mismas a la destrucción autoinmune [79, 80]. El ataque autoinmune contra las células beta se induce mediante la vacunación de los animales con una vacuna de ADN que contiene un plásmido con el gen de la preproinsulina (*Ppins*) II murina (*Plasmid Factory*, Alemania).

En la presente tesis se emplearon ratones RIP-B7.1 heterocigotos de primera generación (C57BL/6J x RIP-B7.1), machos y hembras. La diabetes autoinmune experimental se indujo mediante la inyección de 50 µg del plásmido de ADN (disuelto en 50 µl de PBS) en ambos músculos tibiales anteriores cuando los ratones alcanzaron una edad de 4 a 7 semanas [79]. En el grupo control, se seleccionaron animales del mismo genotipo, edad y sexo que el grupo experimental, y se les inyectó PBS. Para establecer el inicio de la diabetes, la glucemia se monitorizó con un glucómetro automático (*Accu-Check Compact plus*, Roche) cada dos días mediante muestras de sangre obtenidas de la vena de la cola en estado de alimentación. Los animales se consideraron diabéticos cuando dos medidas de glucemia en días consecutivos superaron los 250 mg/dl [79].

Los animales se emplearon una semana tras el inicio de la enfermedad para el estudio de las adaptaciones de la célula alfa en un estadio temprano de diabetes autoinmune, y cuatro semanas tras el inicio de la diabetes para el estudio de un estadio avanzado. Todos los estudios fueron aprobados por el Comité de Ética Animal de la Universidad Miguel Hernández de Elche de acuerdo a las regulaciones nacionales.

#### **III.2. Medidas hormonales en plasma y páncreas.**

En ambos estadios de diabetes se realizaron las medidas de glucemia, insulina y glucagón plasmáticos en estado de alimentación. La glucemia se midió con un glucómetro automático (*Accu-Check Compact plus*, Roche) a partir de muestras sanguíneas obtenidas de la vena de la

cola. Para las medidas hormonales, los animales se anestesiaron con CO<sub>2</sub> y tras su decapitación, la sangre se recolectó en un tubo *Microvette* (Sarstedt) en presencia de EDTA K2 y aprotinina a 500 KIU/ml (Sigma-Aldrich), para evitar la degradación del glucagón [98]. La sangre se centrifugó a 1600 rpm durante 20 minutos a 4°C y posteriormente se separó el plasma. Para la medición del contenido total de insulina y glucagón pancreáticos, los páncreas fueron diseccionados e incubados durante toda la noche con 5 ml de etanol ácido (75% EtOH, 1,5% HCl) a -20°C. Tras la incubación, las muestras se homogeneizaron y fueron reincubadas durante toda la noche a -20°C. A continuación, los extractos pancreáticos se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se neutralizaron con Tris 1 M (pH 7.4).

Los niveles de glucagón e insulina en plasma y en la totalidad del páncreas se midieron mediante ensayo ELISA (Mercodia, número de catálogo 10-1271-01 y CristalChem, 90080, respectivamente) siguiendo las instrucciones comerciales. Los resultados del contenido hormonal pancreático fueron normalizados por el contenido proteico total del páncreas, obtenido mediante ensayo Bradford.

### **III.3. Preparación de muestras histológicas.**

Para el estudio histológico se emplearon 5 ratones diabéticos en un estadio temprano (una semana tras el inicio de la hiperglucemia) y 5 ratones diabéticos en un estadio avanzado (cuatro semanas tras el inicio), con sus respectivos controles no diabéticos de la misma edad y sexo. Tras la decapitación de los animales y la extracción sanguínea detallada en el punto anterior, los páncreas fueron diseccionados, limpiando la grasa y los ganglios linfáticos. Los tejidos fueron dispuestos en casetes de histología y fijados con paraformaldehído al 4% en PBS durante 22 horas a 4°C. Tras la fijación, los páncreas se transfirieron a PBS y se pesaron antes de proceder a embeberlos en parafina para la creación de bloques y su posterior procesamiento. Los páncreas embebidos se cortaron en un micrótopo modelo RM2245 (Leica, Alemania). Se realizaron secciones de 5 µm de grosor con representación de toda la superficie del páncreas. Para todos los estudios detallados a continuación, se emplearon de dos a tres secciones pancreáticas, separadas un mínimo de 200 µm entre sí para examinar distintas regiones representativas del tejido.

### **III.4. Análisis inmunohistoquímico de la masa y tasa de proliferación de la célula alfa pancreática.**

El estudio de la masa de la célula alfa pancreática y su tasa de proliferación celular se llevó a cabo mediante la realización de una doble tinción inmunohistoquímica empleando el kit “EnVision G/2 Doublestain System DAB+/Permanent Red” (DAKO K5361, Agilent Technologies). Este kit comercial permite la detección simultánea de dos antígenos diferentes de forma visual en la misma muestra mediante dos reacciones distintas basadas en la revelación del antígeno con cromógeno.

En primer lugar, los cortes parafinados de páncreas se desparafinaron a 65°C durante media hora en una estufa, tras lo cual se sumergieron en xileno durante media hora y, posteriormente se rehidrataron mediante una cadena de etanol a distintas concentraciones decrecientes. A continuación, se realizó el desenmascaramiento de los antígenos hirviendo las muestras en tampón citrato (12 mM, pH 6) durante 10 minutos. Tras enfriar las muestras, se incubaron con suero de albúmina bovino (BSA) al 3% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente.

Primera reacción. Siguiendo las instrucciones del kit comercial, las muestras se incubaron con un bloqueante de enzimas endógenas proporcionado por el kit, seguido por la incubación con un anticuerpo primario contra PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*, Cell Signaling, #2586) obtenido en ratón a una concentración de 1:4000 diluido en 3% BSA [98]. Este anticuerpo permite visualizar los núcleos en proliferación. Tras la incubación a 4°C durante toda la noche, las muestras se cubrieron con el reactivo *Polymer/HRP*. Este reactivo es un polímero con peroxidasa (*HRP*) conjugada que presenta afinidad para inmunoglobulinas de ratón, permitiendo la visualización del PCNA mediante la aplicación del cromógeno 3,3'-diaminobencidina (DAB) durante 60 segundos. Mediante este método se consigue teñir de color marrón los núcleos positivos para PCNA.

Segunda reacción. Tras el revelado con DAB, la primera reacción se bloquea incubando las muestras con el reactivo de bloqueo proporcionado por el kit, y seguidamente se incuban con el segundo anticuerpo primario. Para la visualización de células alfa, empleamos un anticuerpo anti-glucagón producido en conejo (Monosan, PS087) a una concentración 1:100, diluido en 3% BSA. La incubación se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C. A continuación, las muestras se incubaron con un polímero con anticuerpos secundarios conjugados que presentan reactividad contra inmunoglobulinas de conejo, seguido por la aplicación del reactivo *Polymer/AP*, que permite la visualización de la segunda reacción al aplicar el cromógeno *Permanent Red* durante 20 minutos. Mediante esta segunda reacción se consigue la visualización del glucagón en color rosa.

Finalmente, las muestras fueron teñidas con hematoxilina para la visualización de la totalidad de los núcleos y los cubres se montaron con medio de montaje Faramount (DAKO, Agilent Technologies). Las muestras fueron fotografiadas a una magnificación de 4x para la cuantificación del área total pancreática y a 20x para los islotes de Langerhans y las áreas positivas para glucagón. Para el estudio de la masa de la célula alfa y proliferación en el estadio temprano de diabetes, se empleó un microscopio Nikon Eclipse TE200 con una cámara Kappa ACC1 integrada. Para el estudio del estadio avanzado de diabetes se empleó un microscopio Olympus IX71S8F-2 con una cámara de Image Development Systems. Tras la obtención de las imágenes, se midió el área total pancreática y el área positiva para glucagón con el programa de análisis Metamorph [98, 175]. Por último, la tasa de proliferación celular de la célula alfa pancreática se obtuvo mediante el conteo de células positivas para glucagón con núcleo positivo para PCNA relativizado por el número total de células alfa.

### **III.5. Técnicas de inmunofluorescencia**

Los estudios de apoptosis, neogénesis y plasticidad de la célula alfa pancreática se realizaron mediante técnicas de inmunofluorescencia, cuyos respectivos protocolos se encuentran detallados a continuación. Todas las imágenes se obtuvieron con un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 (Carl Zeiss), equipado con un sistema ApoTome, permitiendo la obtención de secciones ópticas empleando microscopía de iluminación estructurada (*Structural Illumination Microscopy*, SIM). La tecnología SIM permite la obtención de una resolución similar a un microscopio confocal [176]. En todos los experimentos detallados a continuación, se emplearon secciones pancreáticas de 5  $\mu\text{m}$  de grosor, fotografiadas para su análisis empleando un objetivo EC Plan-NEOFLUAR 40x. Las secciones ópticas obtenidas con dicho objetivo y el sistema ApoTome fueron de 0.70  $\mu\text{m}$ . La cuantificación se realizó de forma manual empleando el programa de análisis Metamorph.

#### Apoptosis

La cuantificación de la tasa de apoptosis de la célula alfa pancreática se realizó mediante inmunofluorescencia con el ensayo TUNEL [98, 175]. En primer lugar, los cortes parafinados de páncreas se desparafinaron a 65°C durante media hora en una estufa, tras lo cual se sumergieron en xileno durante media hora y, posteriormente se rehidrataron mediante una cadena de etanol a distintas concentraciones decrecientes. A continuación, se realizó el desenmascaramiento de los antígenos hirviendo las muestras en tampón citrato (12 mM, pH 6) durante 20 minutos, seguido del tratamiento con tampón Tris-HCl (0.1 M, pH 7.5) en presencia

de 3% BSA y 20% FBS (suero fetal bovino), durante 20 minutos a 37°C. Las muestras se incubaron con la mezcla del kit TUNEL (Roche Diagnostics, USA) durante 1 hora a 37°C y posteriormente se incubaron con BSA al 3% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente para bloquear uniones inespecíficas.

La detección de células alfa se realizó mediante la incubación de las muestras con un anticuerpo anti-glucagón obtenido en conejo (Monosan, PS087) a una concentración de 1:100 diluido en 3% BSA, a 4°C durante toda la noche. A continuación, se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo producido en cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 546 (Life Technologies), a una concentración de 1:500 diluido en 3% BSA y en presencia de 1% de suero de cabra. Finalmente, los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido a 1:1000 en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con el medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen).

#### Neogénesis a partir del epitelio ductal

El análisis de la presencia de neogénesis de célula alfa a partir del epitelio ductal pancreático se realizó mediante el estudio de la positividad de citoqueratinas en células glucagón positivas, empleando un anticuerpo de amplio espectro para la detección de estas proteínas, pan-CK (*pan-cytokeratin*).

Las secciones de páncreas se desparafinaron a 65°C durante media hora en una estufa, seguido de su inmersión en xileno durante media hora y posterior rehidratación mediante una cadena de etanoles a distintas concentraciones decrecientes. A continuación, se realizó el desenmascaramiento de los antígenos hirviendo las muestras en tampón citrato (12 mM, pH 6) durante 20 minutos y con una incubación con tripsina (0.5 mg/ml) durante 30 minutos a 37°C [177]. Posteriormente se incubaron con BSA al 3% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente para bloquear uniones inespecíficas.

La detección de células alfa se realizó mediante la incubación de las muestras con un anticuerpo anti-glucagón de conejo (Monosan, PS087) a una concentración de 1:100 diluido en 3% BSA, a 4°C durante toda la noche. A continuación, se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 546 (Life Technologies), a una concentración de 1:500 diluido en 3% BSA y en presencia de 1% de suero de cabra. A continuación, se realizó un segundo bloqueo con BSA al 3% antes de incubar las muestras con el segundo anticuerpo primario, pan-CK de

ratón (Santa Cruz Biotechnology, sc-8018) a una concentración de 1:300 diluido en 3% BSA, a 4°C durante toda la noche. Para la detección de la pan-CK mediante fluorescencia, se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 488 (Life Technologies), a una concentración de 1:500 diluido en 3% BSA y en presencia de 1% de suero de cabra. Finalmente, los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido a 1:1000 en PBS, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los cubreobjetos se montaron con el medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen).

### Análisis de potenciales eventos de transdiferenciación de la célula alfa pancreática

El estudio de la plasticidad de la célula alfa pancreática se realizó mediante dos enfoques. En primer lugar, se evaluó la presencia de células bi-hormonales que expresan tanto insulina como glucagón, como marcador de transdiferenciación celular [87, 101, 178, 179]. A continuación cuantificamos la presencia de células glucagón positivas que expresan el factor de transcripción PDX1, específico de células beta pancreáticas, como indicador de cambios en la identidad de las células alfa pancreáticas [87, 101, 180].

Los cortes histológicos de páncreas se desparafinaron a 65°C durante media hora en una estufa, seguido de su sumersión en xileno durante media hora y posterior rehidratación mediante una cadena de etanoles a distintas concentraciones decrecientes. A continuación, se realizó el desenmascaramiento de los antígenos hirviendo las muestras en tampón citrato (12 mM, pH 6) durante 20 minutos, seguido de una incubación con BSA al 3% en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente. Para la detección de células alfa, las secciones se incubaron con un anticuerpo anti-glucagón de ratón (Sigma, C2654) a una concentración de 1:100 diluido en 3% BSA, a 4°C durante toda la noche. A continuación, se realizó una incubación durante 2 horas a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 546 (Life Technologies), a una concentración de 1:500 diluido en 3% BSA y en presencia de 1% de suero de cabra. A continuación, se realizó un segundo bloqueo con BSA al 3% antes de incubar las muestras con el segundo anticuerpo primario, anti-insulina de conejo (Santa Cruz Biotechnology, C1212) a una concentración de 1:100 en 3% BSA, a 4°C durante toda la noche. Su detección se realizó con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 488 (Life Technologies), a una concentración de 1:500 diluido en 3% BSA y en presencia de 1% de suero de cabra. Por último, los núcleos se marcaron con Hoechst 33342 (Invitrogen) diluido a 1:1000 en PBS, durante 10 minutos a temperatura



ambiente. Los cubreobjetos se montaron con el medio de montaje *Prolong Gold Antifade Reagent* (Invitrogen).

Para el análisis de expresión de PDX1 en células alfa mediante inmunofluorescencia se empleó el protocolo detallado arriba con los siguientes anticuerpos primarios y secundarios: anti-glucagón de conejo (Monosan PS087, 1:100), anti-PDX1 de cobaya (Abcam, ab47308, 1:200), anti-conejo de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 546 (Life Technologies, 1:500) y anti-cobaya de cabra conjugado con fluorocromo Alexa-Fluor 488 (Life Technologies, 1:500).

### **III.6. Grado de insulitis y glucagón**

El estudio de la correlación entre el grado de insulitis (infiltración linfocitaria del islote) y el grado de glucagón que presentan los islotes de Langerhans de los ratones diabéticos, se realizó mediante la clasificación de los islotes según el porcentaje de insulitis y glucagón que conforman el área del islote [179, 181]. Las células del sistema inmune presentes en los islotes de Langerhans se detectaron mediante la tinción de hematoxilina realizada en las muestras empleadas para el estudio de la masa y proliferación de la célula alfa pancreática. Las células del infiltrado linfocitario presentan un característico núcleo denso y un pequeño tamaño que permite su visualización con dicha tinción [45, 181].

Los grados de insulitis / glucagón se distribuyeron según los siguientes porcentajes:

- Grado 0: islotes sin presencia de insulitis o marcaje para el glucagón.
- Grado 1: menos del 10% del islote está ocupado por insulitis o marcado para el glucagón.
- Grado 2: entre el 10% y el 55% del islote está ocupado por insulitis o marcado para el glucagón.
- Grado 3: entre el 55% y el 75% del islote está ocupado por insulitis o marcado para el glucagón.
- Grado 4: más del 75% del islote está ocupado por insulitis o marcado para el glucagón.

Se evaluaron todos los islotes de los cortes histológicos empleados. La medida del área del islote formada por insulitis y glucagón se realizó de forma manual mediante el programa Metamorph. A continuación, se asignó un grado de insulitis y un grado de glucagón para cada islote analizado y se realizó un análisis de correlación entre ambos factores con el programa GraphPad Software v5.

### **III.7. Representación y análisis estadístico de los datos.**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Software v5. Tras comprobar la normalidad de los datos, se realizó una prueba t de student o el test no paramétrico Mann-Whitney, cuando las variables no se distribuyeron de acuerdo a la normalidad. En los casos requeridos se aplicó el test 2 way ANOVA con corrección de Bonferroni. En cada gráfica, el valor correspondiente a cada animal empleado se encuentra representado por un punto. Los datos se representan en todos los casos como la media  $\pm$  el error estándar (SEM) y la significancia estadística se estableció al obtener un valor  $p < 0.05$ .





Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

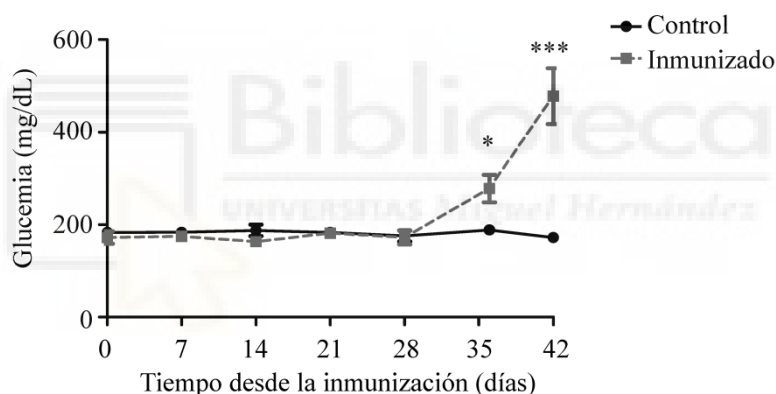
## **IV. RESULTADOS**



## IV. RESULTADOS

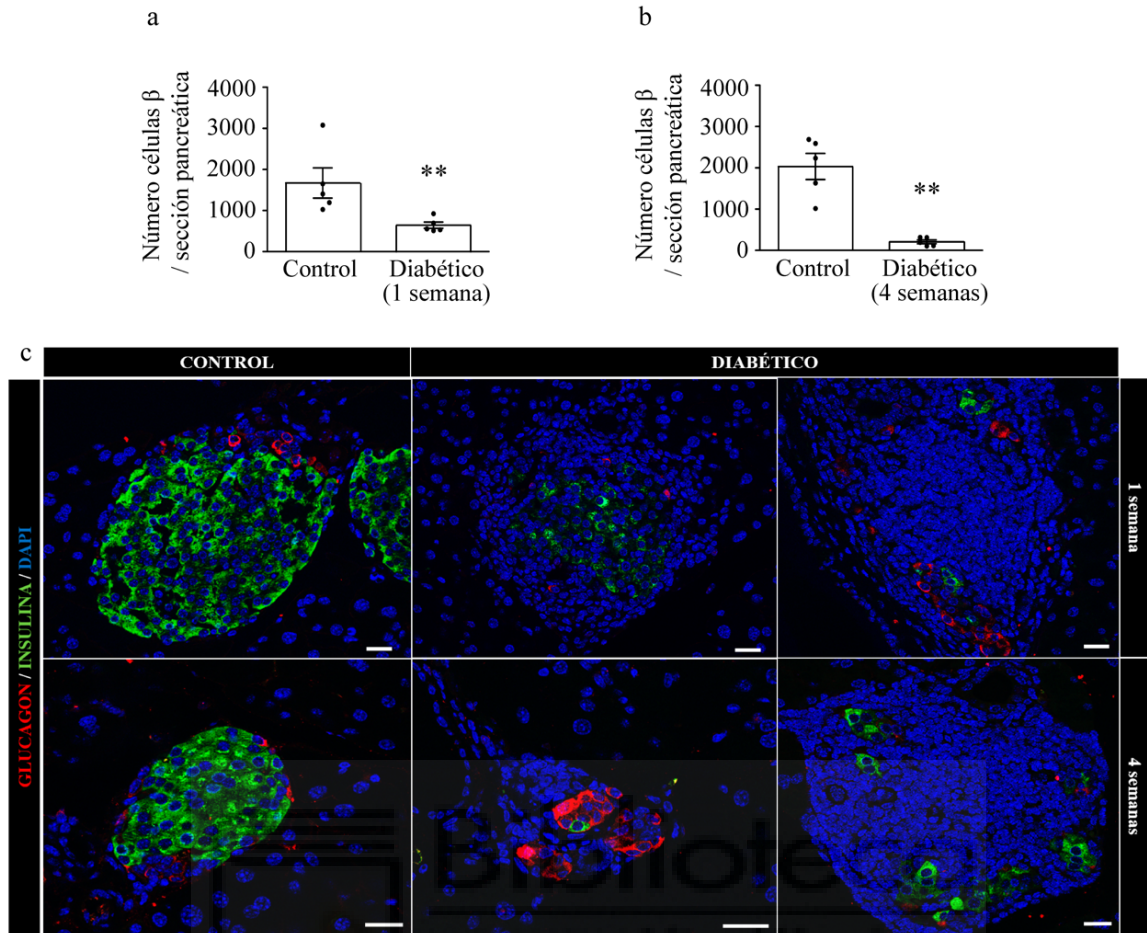
### IV.1. Desarrollo de la diabetes autoinmune experimental (EAD).

Durante el desarrollo de la diabetes autoinmune experimental en los animales RIP-B7.1, la población beta pancreática es destruida por un ataque autoinmune específico contra este tipo celular [79, 80], generando una respuesta inflamatoria en los islotes de Langerhans. El resultado sintomatológico más característico de la destrucción de la población beta pancreática es la aparición de hiperglucemia. En este modelo de EAD, la aparición de la hiperglucemia se emplea como elemento determinante para establecer el inicio de la diabetes [79, 80]. En la **figura 7** se puede observar la evolución de la glucemia en animales diabéticos desde la administración de la vacuna de ADN (tiempo 0). Aproximadamente 35 días desde la vacunación, los animales desarrollaron hiperglucemia y el debut de la diabetes se estableció con dos medidas de glucemia en días consecutivos superiores a 250 mg/dL.



**Figura 7.** Cambios en la glucemia tras la inmunización con la vacuna de ADN en ratones RIP.B7.1. Representación de los valores de glucemia en un grupo de animales (n=5) que desarrollaron diabetes en el mismo rango temporal tras la administración en el día 0 de la vacuna de ADN que contiene el plásmido de la preproinsulina. Significancia estadística: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

Durante el desarrollo de la presente tesis, los animales se emplearon una semana tras el establecimiento de la diabetes para el estudio de un estadio temprano de EAD, y cuatro semanas después del debut para estudiar un estadio avanzado de la diabetes. En ambos estadios pudimos observar un infiltrado linfocitario en los islotes de Langerhans de los ratones diabéticos, así como una disminución del número de células beta pancreáticas detectadas mediante inmunofluorescencia (**Fig. 8**), indicando la efectividad de la vacuna de ADN y la ablación de esta población.

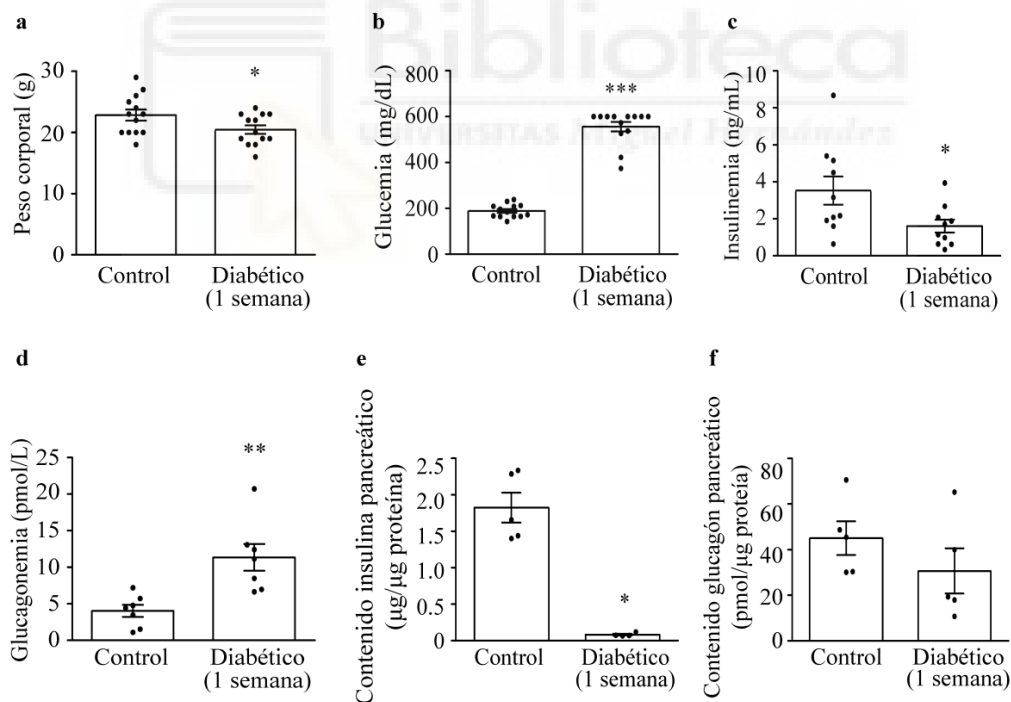


**Figura 8.** Ablación de la población beta pancreática en el ratón RIP-B7.1. Número de células beta por sección pancreática una semana (**a**) y cuatro semanas (**b**) tras el debut de la diabetes. N= 5 ratones/condición, 2 secciones pancreáticas. (**c**) Imágenes representativas de islotes de Langerhans de ratones control y diabéticos obtenidas mediante inmunofluorescencia. Islotes representativos de dos animales diabéticos diferentes en ambos estadios de EAD con sus controles correspondientes. En las imágenes se pueden observar células positivas para insulina (verde), glucagón (rojo) y núcleos (azul). En los animales diabéticos se observa una acumulación de núcleos densos pequeños infiltrando el islote, indicando la existencia de insulinitis. Significancia estadística: \*\*,  $p < 0.01$ .

## IV.2. Caracterización del modelo de EAD en un estadio temprano de diabetes

La caracterización del modelo de EAD en un estadio temprano de diabetes se realizó una semana tras el debut de la enfermedad. En este estadio, los animales diabéticos presentaron una disminución del peso corporal (**Fig. 9a**). El promedio de los valores de peso corporal fue de  $22.85 \pm 0.91$  g para los controles y  $20.46 \pm 0.69$  g en los animales diabéticos. En estado alimentado, los animales diabéticos presentaron hiperglucemia (grupo control:  $188.7 \pm 8.09$  mg/dl, grupo diabético:  $556.4 \pm 20.89$  mg/dl) y una marcada disminución en los niveles de insulina plasmática (grupo control:  $3.53 \pm 0.76$  ng/ml, grupo diabético:  $1.60 \pm 0.35$  ng/ml) en comparación con los animales control (**Fig. 9 b, c**). El estudio del contenido total pancreático de insulina mediante extracción con etanol ácido reveló una disminución significativa del

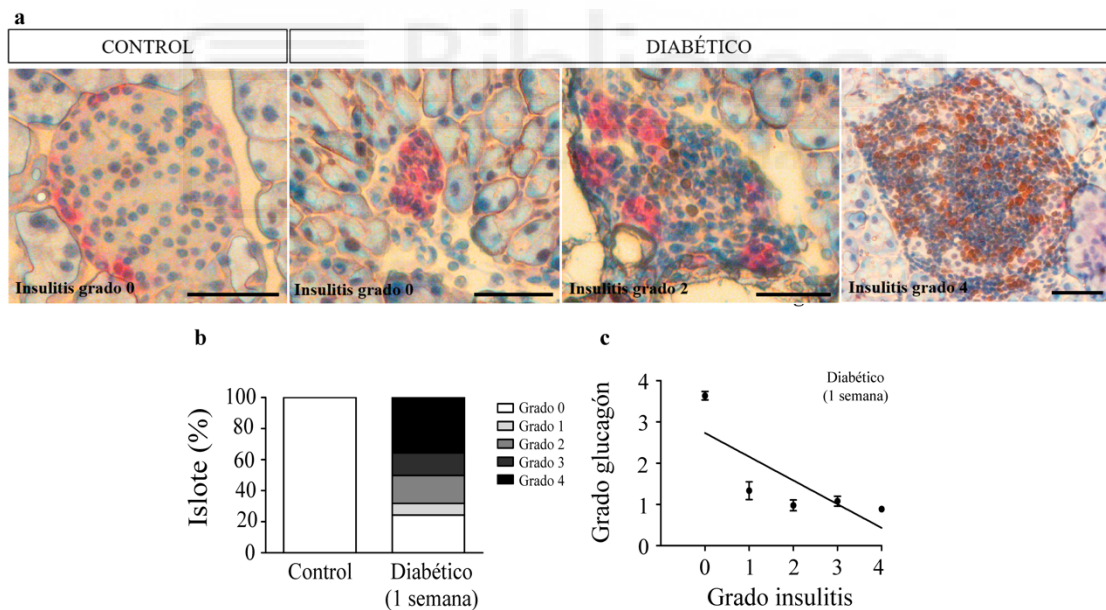
contenido de insulina total del páncreas de los animales diabéticos ( $0.082 \pm 0.01 \mu\text{g}$  insulina/ $\mu\text{g}$  proteína total) en comparación con sus respectivos controles ( $1.82 \pm 0.20 \mu\text{g}$  insulina/ $\mu\text{g}$  proteína total) tras su relativización por el contenido total de proteína pancreática (**Fig. 9e**). Esta disminución del contenido de insulina apoya la destrucción de las células beta pancreáticas en los animales diabéticos observada con la disminución del número de células beta pancreáticas en este estadio (**Fig. 8a**). Además, una semana tras el inicio sintomatológico de la diabetes, los ratones mostraron un aumento significativo de los niveles de glucagón plasmático en estado alimentado (grupo control:  $4.03 \pm 0.83 \text{ pmol/L}$ , grupo diabético:  $11.34 \pm 1.84 \text{ pmol/L}$ ) (**Fig. 9d**). En cambio, el contenido total de glucagón pancreático (**Fig. 9f**) de los animales diabéticos ( $45.03 \pm 7.43 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  proteína total) no presentó cambios significativos respecto a los controles ( $30.65 \pm 9.92 \text{ pmol}/\mu\text{g}$  proteína total), apoyando la ausencia de cambios globales significativos en la masa de la célula alfa pancreática, como se detallará a continuación. Esta caracterización fenotípica del ratón RIP-B7.1 diabético refleja las características de la diabetes autoinmune humana: hiperglucemia, hipoinsulinemia e hiperglucagonemia [142, 182].



**Figura 9.** Glucemia y niveles hormonales en el ratón RIP-B7.1 una semana tras el debut de la diabetes autoinmune experimental. (a) Peso corporal (n=13 por grupo). (b) Glucemia (n=13 por grupo). (c) Insulina plasmática (n=10 por grupo). (d) Glucagón plasmático (n=7 por grupo). (e) Contenido pancreático de insulina (n=5 controles, 4 diabéticos) y (f) glucagón (n=5 por grupo), ambos normalizados por el contenido proteico total del páncreas. Las medidas de glucemia y hormonales se realizaron en estado alimentado. Significancia estadística: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

### IV.3. Estudio de la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en un estadio temprano de diabetes.

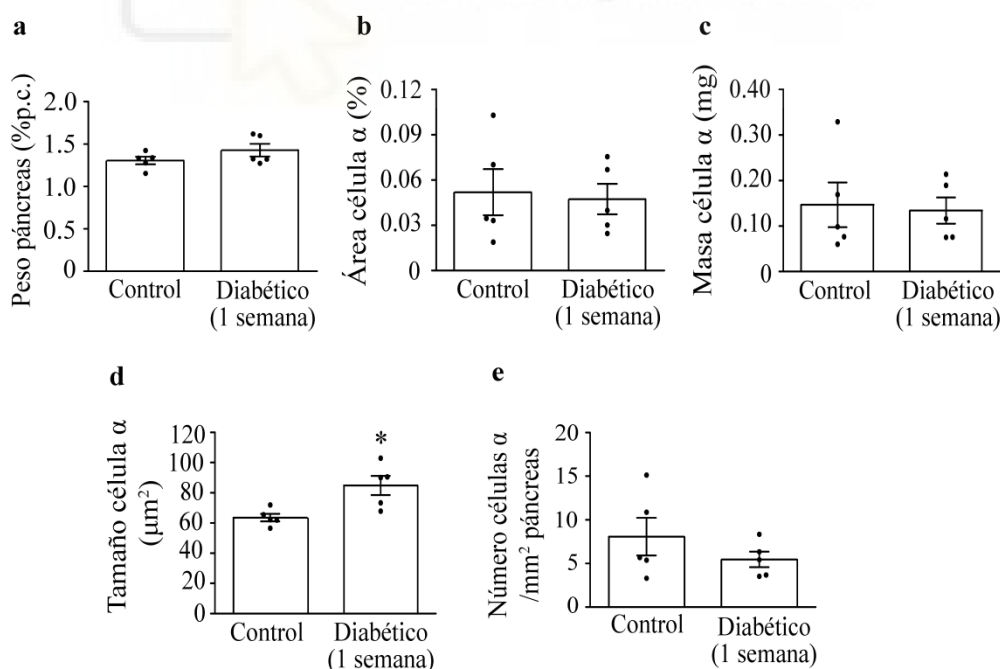
El estudio de la dinámica de la masa de la célula alfa en un estadio temprano de EAD se realizó en cortes de tejido pancreático embebido en parafina, empleando cinco animales diabéticos, una semana tras el debut, y sus respectivos controles de la misma edad y sexo. En estas muestras, los islotes de los animales con diabetes temprana mostraron diferentes grados de insulitis o infiltración linfocitaria de los islotes, mientras que no se observó infiltración en los islotes de los animales control (**Fig. 10a, b**). La clasificación de los islotes de los ratones diabéticos de acuerdo al porcentaje de los mismos ocupado por un área marcada con anticuerpos contra el glucagón e insulitis (**Fig. 10 c**), indicó una correlación negativa no significativa entre estos parámetros ( $R$  de Pearson =  $-0.7839$ ,  $p = 0.11$ ) que podría señalar hacia una disminución de la tinción para glucagón en aquellos islotes que presentan mayor severidad en el grado de insulitis.



**Figura 10.** Grados de insulitis y glucagón en los islotes de Langerhans de ratones control y diabéticos una semana tras el debut. **(a)** Imágenes representativas de islotes de Langerhans de un ratón control y ratones con diabetes temprana. Las imágenes ilustran distintos grados de insulitis, donde se pueden observar células glucagón positivas (rosa) y los núcleos teñidos con hematoxilina. Escala: 50  $\mu$ m. **(b)** Grado de insulitis en los islotes de ratones con diabetes temprana y sus respectivos controles ( $n=288$  islotes de 5 ratones control;  $n=255$  islotes de 5 ratones diabéticos). **(c)** Tendencia a la correlación negativa entre el porcentaje del islote compuesto por glucagón (grado de glucagón) y por insulitis (grado de insulitis) en ratones con diabetes temprana ( $R$  de Pearson= $-0.7839$ ,  $p=0.11$ ). Grado 0: 0%; grado 1 < 10%; 10% < grado 2 > 55%; 55% < grado 3 > 75%; grado 4 > 75% (% del área total del islote).

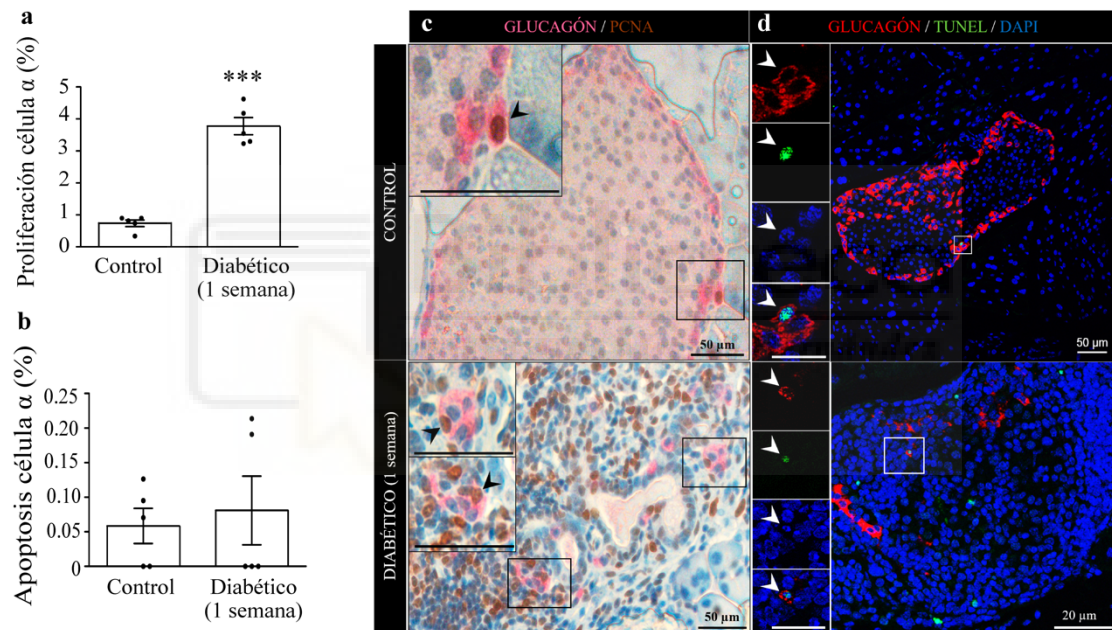


Ambos grupos mostraron un peso similar del páncreas relativizado por el peso corporal (**Fig. 11a**). El promedio del peso de los páncreas sin relativizar fue de  $279.3 \pm 18.86$  mg en los controles y de  $283.9 \pm 13.96$  mg en los diabéticos ( $p=0.85$ ). Para comprobar el efecto del cambio del peso corporal observado en los animales diabéticos (**Fig. 11a**) en el peso pancreático, éste se relativizó por el peso corporal, obteniendo valores similares entre ambos grupos (control:  $1.31 \pm 0.044$  %, diabético:  $1.43 \pm 0.07$  %). Los ratones con un estadio temprano de diabetes no presentaron cambios en el área de la célula alfa respecto a la superficie total pancreática (control:  $0.052 \pm 0.01$  %, diabético:  $0.047 \pm 0.01$  %) (**Fig. 11b**), ni en la masa de célula alfa relativizada por el peso pancreático (control:  $0.15 \pm 0.05$  mg, diabético:  $0.13 \pm 0.03$  mg) (**Fig. 11c**). Ambos resultados presentan consistencia con el mantenimiento del contenido total pancreático de glucagón observado en este estadio de diabetes (**Fig. 9f**). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en la masa de célula alfa ( $p=0.83$ ), el número relativo de este tipo celular presentó una reducción no significativa del 33% en los animales diabéticos ( $p=0.29$ ) (**Fig. 11e**), que podría haber sido compensada por un aumento del tamaño de la célula alfa o hipertrofia en los animales diabéticos ( $84.94 \pm 6.34 \mu\text{m}^2$ ) en comparación con los controles ( $63.59 \pm 2.52 \mu\text{m}^2$ ) (**Fig. 11d**), dando lugar a valores normales de área y masa de la célula alfa pancreática (**Fig. 11b, c**). Por lo tanto, una semana tras el debut de la diabetes encontramos un mantenimiento de la masa de célula alfa en los animales diabéticos en comparación con sus controles.



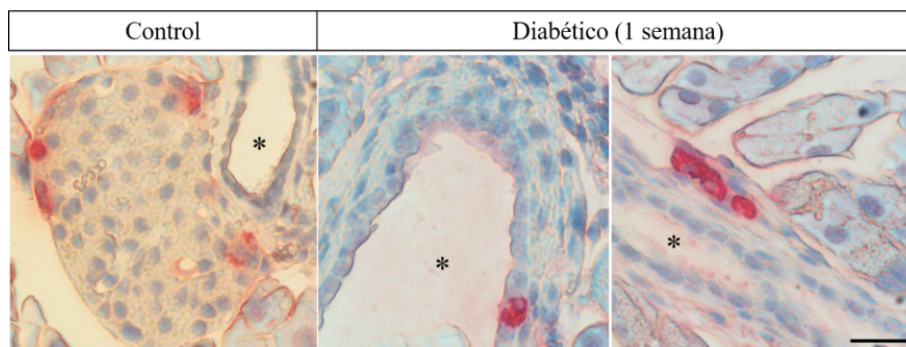
**Figura 11.** Estudio de la masa de la célula alfa pancreática una semana tras el debut de la diabetes. (A) Peso del páncreas relativizado por el peso corporal (p.c.). (B) Área de la célula alfa expresada como porcentaje del área glucagón positiva del páncreas respecto al área total del mismo. (C) Masa de la célula alfa relativizada por el peso del páncreas. (D) Tamaño de la célula alfa. (E) Número relativo de células alfa respecto al área pancreática. N = 5 ratones por condición. 2 secciones pancreáticas por animal. Significancia estadística: \*,  $p < 0.05$ .

A continuación, para estudiar si en el mantenimiento de masa de la célula alfa en la diabetes temprana del ratón RIP-B7.1 han participado otros factores además de la hipertrofia, estudiamos las tasas de proliferación y apoptosis de este tipo celular. El estudio de la tasa de proliferación asociada al número de células alfa positivas para el marcador de proliferación PCNA reveló una tasa de proliferación en los ratones control del  $0.74 \pm 0.10$  %, mientras que la de los diabéticos aumentó a un  $3.77 \pm 0.27\%$ . Por lo que los ratones con diabetes temprana presentan un incremento significativo en el número de células alfa en proliferación (**Fig. 12a, c**). En cambio, la tasa de apoptosis de la célula alfa pancreática analizada mediante el ensayo TUNEL no presentó cambios significativos ( $p=1.0$ ) entre el grupo control ( $0.06 \pm 0.02$  %) y diabético ( $0.08 \pm 0.05\%$ ) (**Fig. 12b, d**).



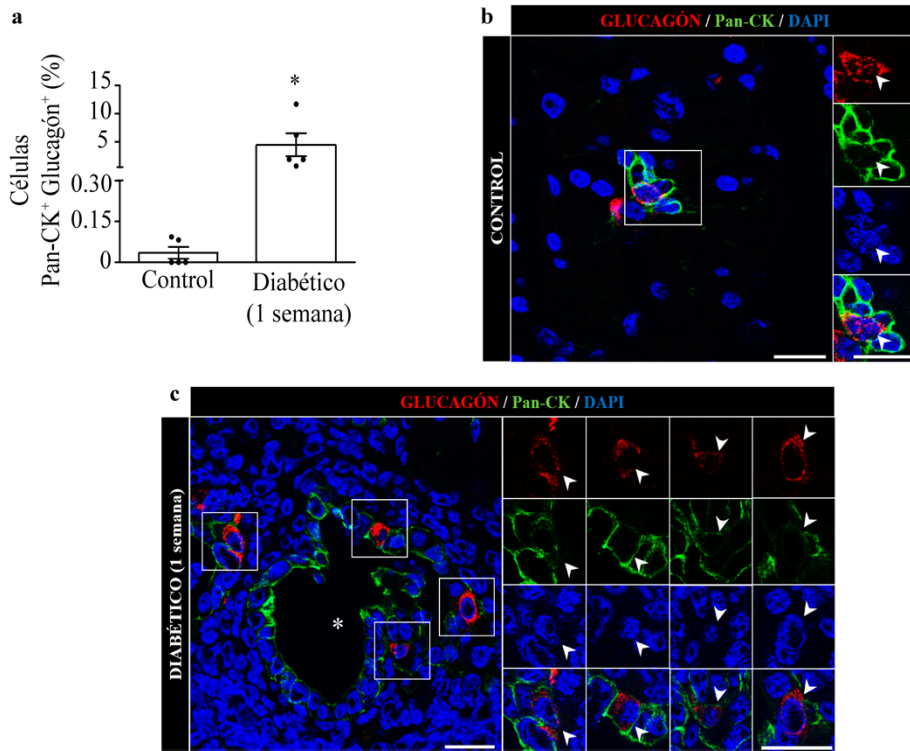
**Figura 12.** Cuantificación de las tasas de proliferación y apoptosis de la célula alfa pancreática en la diabetes temprana. **(a)** Tasa de proliferación calculada como porcentaje de células alfa positivas para PCNA respecto al número total de células alfa. **(b)** Tasa de apoptosis calculada como porcentaje de células doble positivas para TUNEL y glucagón respecto al número total de células alfa. **(c)** Imágenes representativas mostrando células alfa en proliferación. Los paneles de la izquierda muestran aumentos de las áreas enmarcadas en la imagen principal (escala: 50  $\mu$ m). Las flechas indican células alfa (rosa) positivas para PCNA (marrón). **(d)** Imágenes representativas en las que se observan células alfa apoptóticas en ratones diabéticos y control. Los paneles de la izquierda muestran aumentos de las áreas enmarcadas (escala: 20  $\mu$ m). Las flechas blancas indican células alfa (rojo) positivas para el marcador de apoptosis TUNEL (verde). Los núcleos se muestran en azul. N=5 ratones por condición. Significancia estadística: \*,  $p<0.05$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

El siguiente paso en la investigación de la dinámica de la masa de la célula alfa fue el estudio de la presencia de neogénesis celular a partir de precursores no endocrinos como el epitelio ductal pancreático. Este proceso de neogenesis contribuye de forma positiva en la modulación de la masa de las células endocrinas del páncreas durante la embriogénesis del ratón y en modelos murinos de daño pancreático [86, 183]. De forma cualitativa, durante el estudio de la masa de la célula alfa en los ratones diabéticos observamos células glucagón positivas cerca de los ductos pancreáticos o pertenecientes a su epitelio (**Fig. 13**), que podrían indicar un proceso de neogénesis de células alfa a partir de los ductos.



**Figura 13.** Presencia de células alfa en el epitelio ductal pancreático. Imágenes representativas en la que se puede observar la presencia de células positivas para glucagón (rosa) cerca o dentro del epitelio ductal pancreático en muestras de dos ratones diferentes con diabetes temprana y un control. El lumen del epitelio ductal está indicando con un asterisco (\*). Escala: 50  $\mu$ m.

Con el fin de corroborar esta hipótesis, marcamos mediante inmunofluorescencia el epitelio ductal pancreático empleando un anticuerpo contra citoqueratinas de amplio espectro, pan-CK. De esta forma, conseguimos detectar específicamente las células del epitelio ductal. En este estudio, se detectaron de forma simultánea las células positivas para el marcador ductal y las células positivas para glucagón. Mediante este experimento observamos un aumento en el porcentaje de células doble positivas para ambos marcadores en el páncreas de los animales diabéticos ( $4.48 \pm 2.03$  %) en comparación con los animales control, en los que el número de estas células doble positivas fue casi inexistente ( $0.03 \pm 0.02$  %) (**Fig. 14**). Estos resultados sugieren un proceso de neogénesis de células alfa a partir del epitelio ductal pancreático.



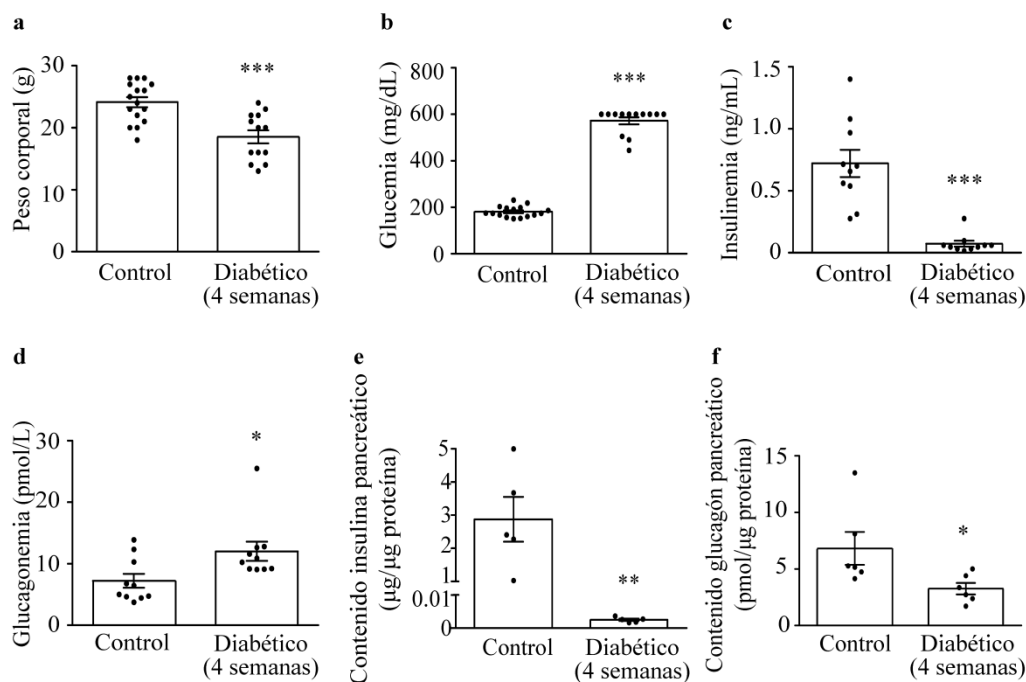
**Figura 14.** Cuantificación de células alfa procedentes del epitelio ductal pancreático en la diabetes temprana. (a) Porcentaje de células doble positivas para glucagón y el marcador del epitelio ductal pan-CK respecto al número total de células alfa en el páncreas de animales diabéticos una semana tras el debut de la enfermedad. En las imágenes representativas se pueden observar células doble positivas para glucagón (rojo) y pan-CK (verde) en un ratón control (b) y diabético (c). Los núcleos totales están marcados en azul. Los paneles de la derecha de cada imagen representativa muestran aumentadas las zonas enmarcadas de la imagen principal. Las flechas blancas señalan las células doble positivas. Escala: 20  $\mu$ m. N=5 animales por condición. Significancia estadística: \*,  $p < 0.05$ .

Por tanto, una semana tras el inicio de la diabetes autoinmune experimental, observamos un mantenimiento de la masa de la célula alfa pancreática. Sin embargo, los contribuidores positivos de la masa, como el tamaño celular, la proliferación y la neogénesis, se encuentran aumentados, sugiriendo la presencia de otros procesos que modulan la masa de la célula alfa pancreática en la EAD, como se detallará a lo largo de la exposición de los resultados obtenidos.

#### IV.4. Caracterización del modelo de EAD en un estadio avanzado de diabetes.

En el estadio temprano de diabetes, las células alfa fueron expuestas durante una semana a un estado de hiperglucemia sostenida y al inicio del colapso homeostático producido por la ablación de la población de células beta. Para analizar la masa de la célula alfa y su modulación en condiciones más establecidas de esta patología metabólica y valorar sus adaptaciones en un estadio avanzado, empleamos animales cuatro semanas tras el debut de la diabetes.

Los animales diabéticos presentaron una disminución del peso corporal (controles:  $24.13 \pm 0.81$  g, diabéticos:  $18.54 \pm 1.06$  g) (**Fig. 15a**). De forma similar a la situación descrita para los animales con diabetes temprana, los animales con diabetes avanzada exhibieron una hiperglucemia muy marcada (controles:  $181.2 \pm 5.89$  mg/dl, diabéticos:  $572.13 \pm 15.02$  mg/dl) (**Fig. 15b**), acompañada por una disminución drástica de la insulina plasmática (controles:  $0.72 \pm 0.11$  ng/ml, diabéticos:  $0.07 \pm 0.02$  ng/ml) (**Fig. 15c**) en estado alimentado. Los niveles de glucagón en plasma continuaron aumentados en este estadio. Los animales diabéticos presentaron un valor de glucagonemia de  $12.01 \pm 1.56$  pmol/L, frente a los  $7.23 \pm 1.15$  pmol/L de los controles, indicando que la hiperglucagonemia en estado postprandial se mantiene con el transcurso de la enfermedad (**Fig. 15d**). El contenido total de insulina del páncreas fue casi indetectable en los animales diabéticos ( $0.002 \pm 0.0003$   $\mu\text{g}/\mu\text{g}$  proteína total). A diferencia de los ratones con diabetes temprana, el contenido total de glucagón pancreático mostró una reducción significativa del 53% en los animales con diabetes avanzada respecto a los animales control (**Fig. 15f**), indicando cambios globales en la masa de la célula alfa pancreática.

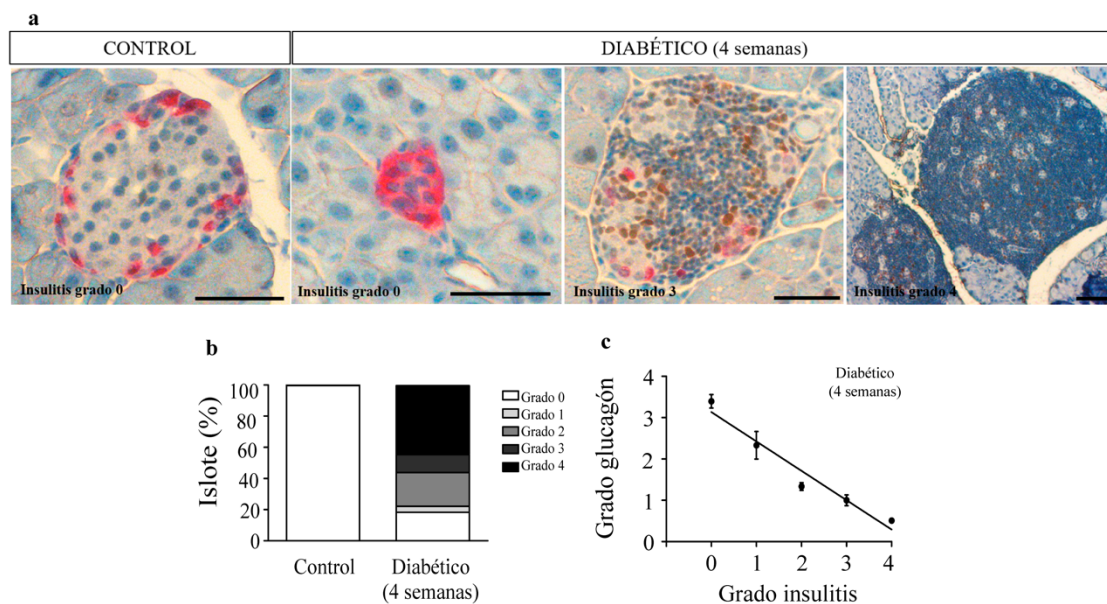


**Figura 15.** Glucemia y niveles hormonales en el ratón RIP-B7.1 cuatro semanas tras el debut de la diabetes autoinmune experimental. (a) Peso corporal (n=16 controles, 13 diabéticos). (b) Glucemia en estado alimentado (n=16 controles, 13 diabéticos). (c) Insulina plasmática (n=10 por grupo). (d) Glucagón plasmático (n=10 por grupo). (e) Contenido pancreático total de insulina (n=5) y (f) glucagón (n=6 por grupo), ambos normalizados por el contenido proteico total del páncreas. Significancia estadística: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .

#### IV.5. Estudio de la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en un estadio avanzado de diabetes.

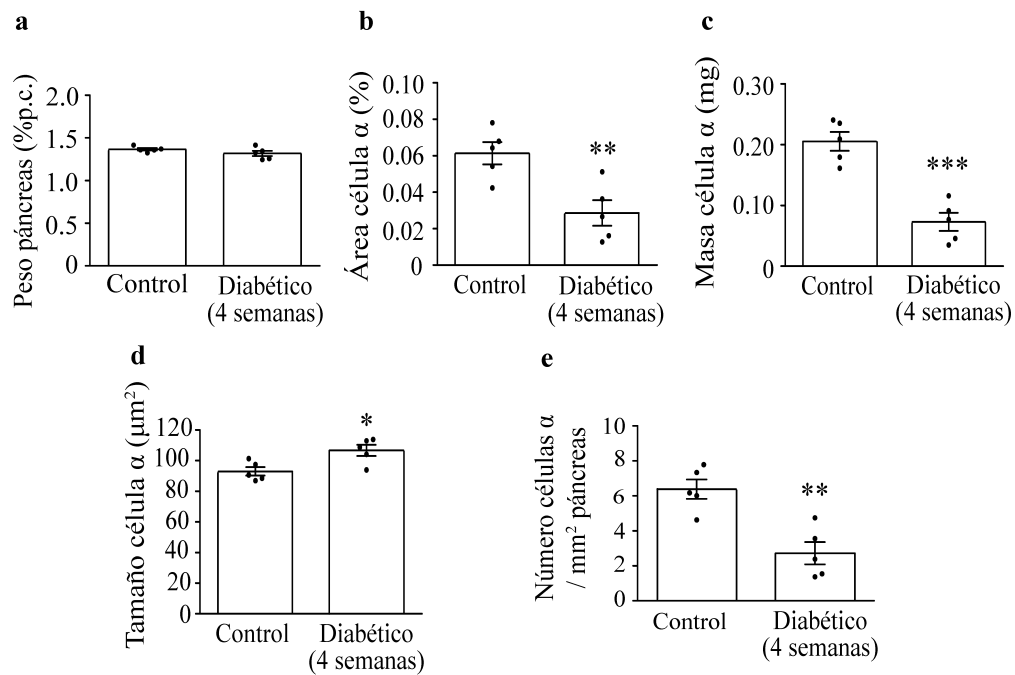
Para realizar el análisis de la dinámica de la masa de la célula alfa en la diabetes avanzada, seguimos la misma línea de estudio empleada en animales con diabetes temprana. Los páncreas de animales con cuatro semanas de diabetes continuaron mostrando infiltración en los islotes de Langerhans, con una mayor severidad de insulinitis que en el estadio temprano, al observar un mayor porcentaje de islotes con insulinitis de grado 4 (diabetes temprana: 35.68%, diabetes avanzada: 44.26%) (Fig. 16a, b). En los ratones controles no se observaron islotes con insulinitis (Fig. 16a, b). En este estadio de diabetes, encontramos una correlación negativa significativa entre el grado de insulinitis y el porcentaje del área del islote formado por células positivas para glucagón (Fig. 16c). Estos datos sugieren que, en la diabetes avanzada, una mayor infiltración del islote conlleva una menor población de células alfa en el mismo.





**Figura 16.** Grados de insulinitis y glucagón en islotes de Langerhans de ratones control y con diabetes avanzada. (a) Imágenes representativas de islotes de Langerhans de un ratón control y ratones con diabetes avanzada. Las imágenes ilustran distintos grados de insulinitis, donde se pueden observar células glucagón positivas (rosa) y los núcleos teñidos con hematoxilina. Escala: 50  $\mu$ m. (b) Grado de insulinitis de ratones con diabetes avanzada y sus respectivos controles (n=352 islotes de 5 ratones control; n=234 islotes de 5 ratones diabéticos). (c) Correlación negativa entre el porcentaje del islote compuesto por glucagón (grado de glucagón) y por insulinitis (grado de insulinitis) en ratones con diabetes temprana (R de Pearson= -0.9745, p<0.01).

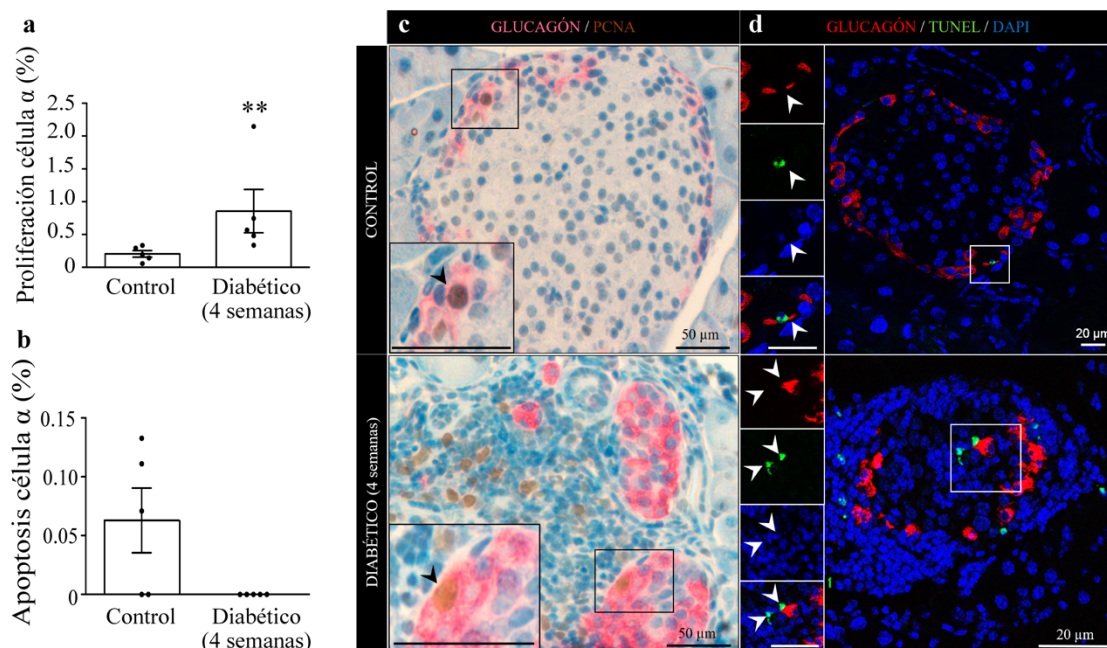
El peso del páncreas de los ratones control fue  $338.6 \pm 13.40$  mg, mientras que en los diabéticos se vio reducido a  $264.9 \pm 11.48$  mg (p=0.003). Como el peso de los animales diabéticos fue menor que los controles (Fig. 15a), el peso del páncreas se relativizó por el peso corporal. De esta forma se observó que el peso del páncreas respecto al peso corporal se encuentra mantenido en los ratones cuatro semanas tras el debut de la diabetes ( $1.32 \pm 0.03\%$ ) en comparación con los controles ( $1.37 \pm 0.01\%$ ) (Fig. 17a). En contraste con el mantenimiento de la masa de la célula alfa pancreática una semana tras el debut de la diabetes, el área y la masa de célula alfa disminuyeron un 46% y un 35% respecto al valor obtenido en los controles, cuatro semanas tras el debut (Fig. 17b, c). El número relativo de células alfa sufrió una reducción del 42% en los animales diabéticos respecto a los controles (Fig. 17e). Estos resultados están en consonancia con la disminución en el contenido total pancreático de glucagón observado en los animales diabéticos (Fig. 15f). No obstante, la hipertrofia de este tipo celular se mantiene durante este estadio de diabetes (Fig. 17d).



**Figura 17.** Estudio de la masa de la célula alfa pancreática cuatro semanas tras el debut de la diabetes. **(a)** Peso del páncreas relativizado por el peso corporal (p.c.). **(b)** Área de la célula alfa expresada como porcentaje del área glucagón positiva del páncreas respecto al área total del mismo. **(c)** Masa de la célula alfa relativizada por el peso del páncreas. **(d)** Tamaño de la célula alfa. **(e)** Número relativo de células alfa respecto al área pancreática. N=5 ratones por condición. Significancia estadística: \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

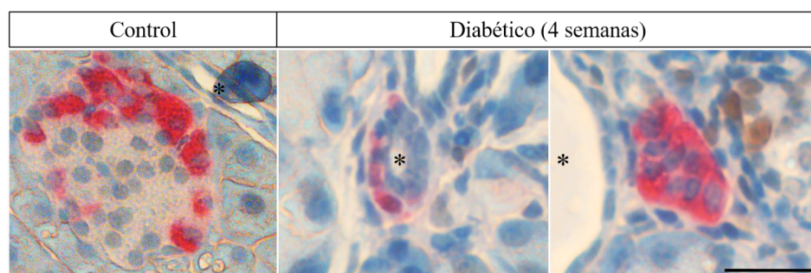
Al igual que en los ratones con diabetes temprana, el estudio de la tasa de proliferación mediante el marcador PCNA, reveló un aumento en este parámetro cuatro semanas tras el debut de la enfermedad (control:  $0.2045 \pm 0.05$  %, diabético:  $0.86 \pm 0.33$  %) (**Fig. 18a, c**). Sin embargo, a pesar de observar numerosos núcleos positivos de células no alfa para TUNEL en los islotes de los animales diabéticos, no encontramos células alfa apoptóticas en este estadio de diabetes (**Fig 18b, d**).





**Figura 18.** Cuantificación de las tasas de proliferación y apoptosis en la diabetes avanzada. **(a)** Tasa de proliferación calculada como porcentaje de células alfa positivas para PCNA respecto al número total de células alfa. **(b)** Tasa de apoptosis calculada como porcentaje de células doble positivas para TUNEL y glucagón respecto al número total de células alfa. No se encontraron células alfa positivas para TUNEL en las muestras de ratones con cuatro semanas de diabetes. **(c)** Imágenes representativas mostrando células alfa en proliferación. Los paneles de la izquierda muestran aumentos de las áreas enmarcadas en la imagen principal (escala: 50  $\mu$ m). Las flechas indican células alfa (rosa) positivas para PCNA (marrón). **(d)** Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para TUNEL en páncreas de ratones control y con diabetes avanzada. Los paneles de la izquierda muestran aumentos de las áreas enmarcadas (escala: 20  $\mu$ m). Las flechas blancas indican células alfa (rojo) positivas para el marcador de apoptosis TUNEL (verde) en la muestra control, y células no alfa apoptóticas en la muestra del ratón diabético. Los núcleos totales se muestran en azul. N=5 ratones por condición. Significancia estadística: \*\*,  $p < 0.01$ .

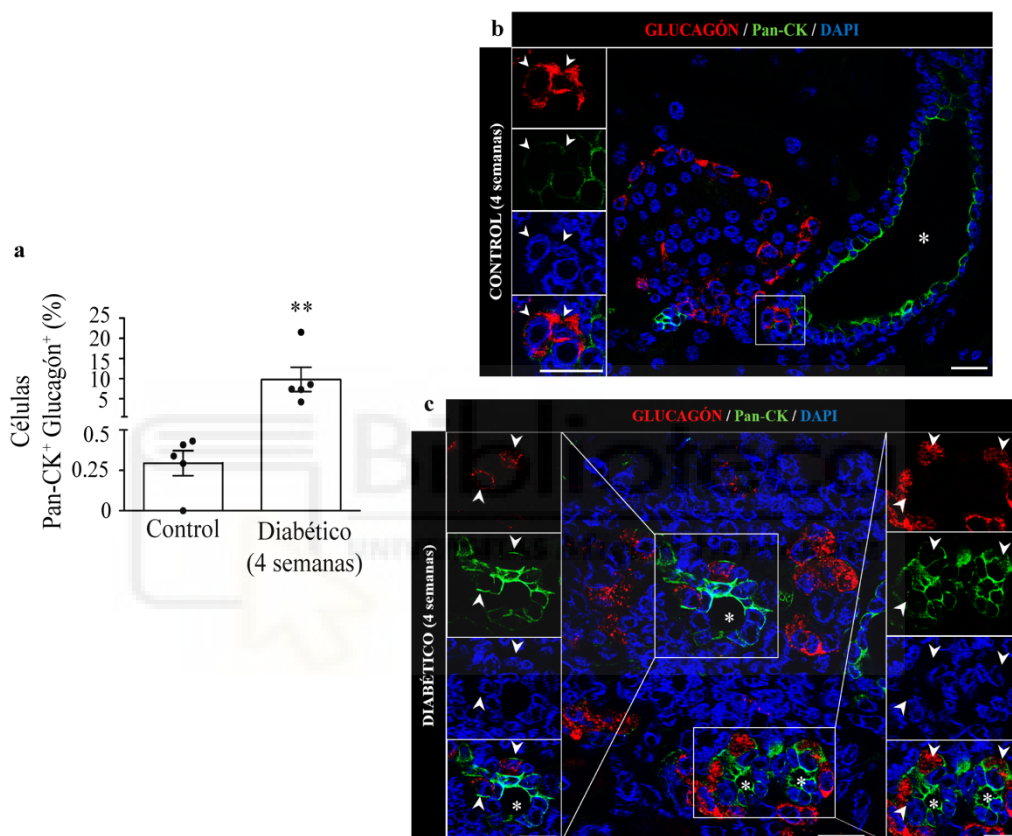
El siguiente paso en la investigación de la modulación de la masa de la célula alfa fue la valoración de la existencia de procesos de neogénesis a partir del epitelio ductal. Durante la realización de los experimentos anteriores, continuamos observando en las muestras de los animales diabéticos la presencia de células positivas para glucagón próximas o pertenecientes al epitelio de los ductos pancreáticos (**Fig. 19**).



**Figura 19.** Presencia de células glucagón positivas asociadas al epitelio ductal en el páncreas de ratones con diabetes avanzada. Imágenes representativas en la que se puede observar la presencia de células positivas para glucagón (rosa)

cerca o dentro del epitelio ductal pancreático en muestras de dos ratones diferentes con diabetes avanzada y un control. El lumen del epitelio ductal está indicando con un asterisco (\*). Escala: 50  $\mu$ m.

Para corroborar esta hipótesis, realizamos un estudio de co-localización de los marcadores pan-CK y glucagón. Al igual que en la diabetes temprana, este análisis reveló un aumento de las células glucagón positivas procedentes del epitelio ductal en los animales diabéticos ( $9.77 \pm 3.01$  %) en comparación con los controles ( $0.29 \pm 0.08\%$ ) (**Fig. 20**), indicando la posibilidad de que el proceso de neogénesis de las células alfa continúa cuatro semanas tras el debut de la diabetes.



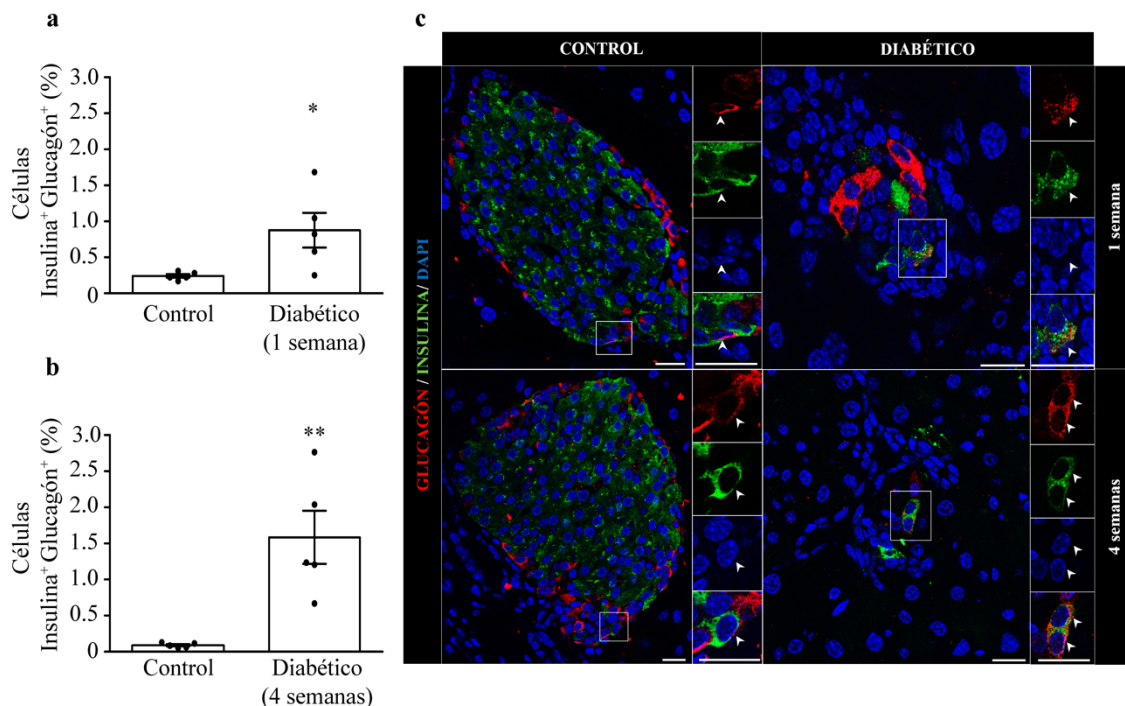
**Figura 20.** Cuantificación de células alfa procedentes del epitelio ductal pancreático en la diabetes avanzada. **(a)** Porcentaje de células doble positivas para glucagón y el marcador del epitelio ductal pan-CK respecto al número total de células alfa. Imágenes representativas de células doble positivas que expresan glucagón (rojo) y pan-CK (verde) en muestras de ratones control **(b)** y diabético **(c)**. Los núcleos totales están marcados en azul. Los paneles de la izquierda y derecha muestran aumentos de las áreas enmarcadas. Las flechas blancas indican células doble positivas. Escala: 20  $\mu$ m. N=5 ratones por condición. Significancia estadística: \*\*,  $p < 0.01$ .

En resumen, el estudio de la modulación de la masa de la célula alfa pancreática en la EAD presenta resultados a priori paradójicos. Los procesos que modulan de forma positiva el balance de la masa están aumentados en ambos estadios estudiados sin que exista un aumento en la masa de la célula alfa o un aumento de los eventos de apoptosis de este tipo celular. Este desbalance podría indicar la presencia de otro mecanismo capaz de modular la masa de la célula

alfa en la EAD. El modelo RIP-B7.1 presenta una ablación de la población beta pancreática mediante un ataque autoinmune diabetogénico. Ha sido descrito en modelos de ablación de este tipo celular que las células alfa son capaces de transdiferenciarse a células beta [87, 101, 178]. Esta transformación podría tener un papel en la modulación de la masa de la célula alfa y podría explicar en parte su mantenimiento y reducción con el avance de la enfermedad. Por ello, se realizaron los experimentos detallados a continuación para evaluar la posibilidad de la existencia de este proceso en la EAD.

#### IV.6. Presencia de mecanismos de transdiferenciación celular en los ratones diabéticos durante el desarrollo natural de EAD.

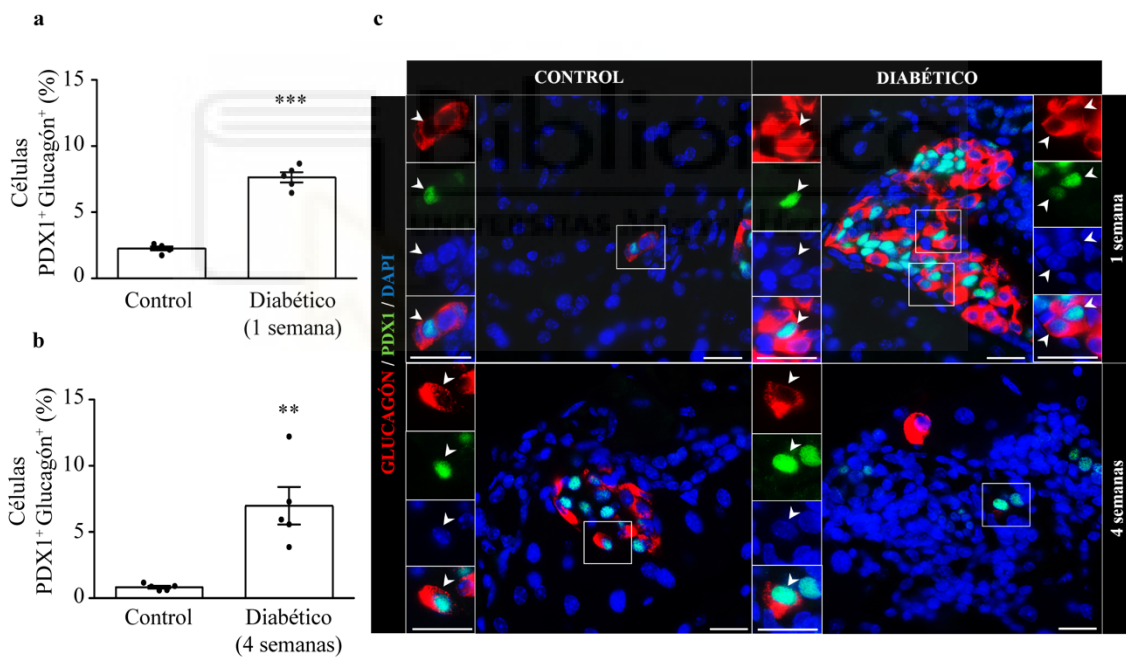
El último paso en el estudio de la modulación de la masa de la célula alfa fue la evaluación de la existencia de procesos de transdiferenciación celular durante la diabetes autoinmune experimental. Para ello, comenzamos analizando la presencia de células que expresan tanto insulina como glucagón. La presencia de este tipo celular bi-hormonal podría indicar un mecanismo de transdiferenciación de célula alfa a célula beta, en el que las células bi-homonales que expresan insulina y glucagón actuarían como intermediario, como ha sido descrito con anterioridad en ratones tras la ablación de la población beta pancreática [87, 101, 180]. El análisis de la presencia de células positivas tanto para insulina como para glucagón, reveló un aumento significativo de estas células bi-homonales en ratones con diabetes temprana ( $0.88 \pm 0.24 \%$ ) y avanzada ( $1.58 \pm 0.37 \%$ ) en comparación con sus respectivos controles ( $0.24 \pm 0.02\%$  y  $0.09 \pm 0.01 \%$ ), respecto al número total de células alfa pancreáticas (**Fig. 21**).





**Figura 21.** Aumento de la presencia de células bi-hormonales que expresan insulina y glucagón en el páncreas de ratones con diabetes temprana y avanzada. Porcentaje de células bi-hormonales positivas para glucagón e insulina respecto al total de células alfa en el páncreas de ratones control y diabéticos una semana (a) y cuatro semanas (b) tras el debut de la diabetes. (c) Imágenes representativas en las que se muestran células doble positivas para insulina (verde) y glucagón (rojo) en ratones control y diabéticos en ambos estadios estudiados. Los núcleos están marcados en color azul. Los paneles de la derecha son aumentos de las áreas enmarcadas en los que las flechas señalan las células bi-hormonales. Escala: 20  $\mu$ m. N=5 ratones por grupo. Significancia estadística: \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $P<0.01$ .

Con el fin de aumentar las evidencias respecto a este hallazgo, evaluamos la presencia de células doble positivas para glucagón y para PDX1, un factor de transcripción que se expresa específicamente en células inmaduras postnatales y en células beta pancreáticas maduras [88]. La expresión de PDX1 en células alfa está asociada a procesos de transdiferenciación celular [62, 87, 180, 184]. El análisis del porcentaje de células positivas para glucagón y PDX1 respecto al número total de células alfa confirmó un incremento en ambos estadios de la diabetes autoinmune experimental (diabetes temprana:  $7.64 \pm 0.38$  %, diabetes avanzada:  $6.98 \pm 1.41$  %), en comparación con sus controles ( $2.27 \pm 0.14$  % y  $0.83 \pm 0.11$  %, respectivamente) (Fig. 22).



**Figura 22.** Aumento de células positivas para glucagón que expresan PDX1 en el páncreas de ratones RIP-B7.1 con diabetes temprana y avanzada. Porcentaje de células doble positivas para glucagón y PDX1 respecto al número total de células positivas para glucagón en ratones control y diabéticos una semana (a) y cuatro semanas (b) desde el debut de la enfermedad. (c) Imágenes representativas en las que se observan células doble positivas para glucagón (rojo) y PDX1 (verde) en animales control y diabéticos. Los núcleos están marcados en azul. Los paneles de la izquierda muestran aumentos de las áreas enmarcadas. Las flechas indican la presencia de células doble positivas. Escala: 20  $\mu$ m. N=5 animales por grupo. Significancia estadística: \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$

El aumento de células bi-hormonales con expresión conjunta de insulina y glucagón, así como de la expresión PDX1 en células glucagón positivas durante el transcurso de EAD indica la posibilidad de la existencia de un proceso de transdiferenciación de células alfa, cuya implicación en la modulación de la masa de este tipo celular se debatirá en la discusión de la presente tesis.







## **V. DISCUSIÓN**





## V. DISCUSIÓN

De forma clásica, la investigación en diabetes tipo I o autoinmune se ha centrado principalmente en la fisiopatología de la célula beta pancreática y en el estudio del ataque autoinmune diabetogénico contra este tipo celular [185]. No obstante, otro tipo celular del islote de Langerhans, la célula alfa pancreática, también tiene un papel fundamental en la diabetes tipo I [182, 186]. A pesar de que las células alfa no son la diana del ataque autoinmune que tiene lugar, este tipo celular sufre alteraciones funcionales y morfológicas durante esta patología [162, 182, 187-191]. Además, estudios recientes en modelos murinos de ablación de la población beta pancreática, evidencian que las células alfa constituyen una fuente potencial para la regeneración de células beta [87]. Esta característica de la célula alfa tiene un importante impacto en el estudio de estrategias terapéuticas para la diabetes tipo I enfocadas a la regeneración de la población beta pancreática. Sin embargo, existe poca información acerca de los procesos que regulan la masa de la célula alfa pancreática en esta patología. El conocimiento de los procesos que intervienen en el balance de la masa de la célula alfa en la diabetes tipo I generaría información para poder enfocar la modulación de la masa de este tipo celular hacia estrategias terapéuticas. En la presente tesis se han estudiado los eventos que regulan la dinámica de la masa de la célula alfa pancreática en la diabetes tipo I, empleando el modelo murino transgénico de diabetes autoinmune experimental (EAD), RIP-B7.1, en dos estadios distintos de la enfermedad.

### V.1. El modelo murino RIP-B7.1 de diabetes autoinmune experimental.

La elección del ratón RIP-B7.1 frente a los modelos murinos más empleados de diabetes tipo I, como el ratón NOD o como la destrucción de la población beta pancreática mediante la administración de STZ, se realizó en base a sus similitudes con la diabetes tipo I humana. De forma similar a la patología humana, la destrucción de las células beta pancreáticas en el ratón RIP-B7.1 está mediada principalmente por linfocitos T CD8 + [80]. En cambio, el ataque autoinmune en el ratón NOD, es efectuado tanto por linfocitos T CD4+ como por CD8+ [185], siendo la población CD4+ la mediadora de la respuesta autoinmune al principio del ataque [192]. Además, el modelo NOD de diabetes espontánea sufre distintas enfermedades relacionadas con su susceptibilidad autoinmune, que normalmente no ocurren en la patología humana [76]. Por otro lado, mediante la administración repetida de dosis bajas de STZ en ratones, se consigue una inflamación local en los islotes de Langerhans derivada de la muerte de las células beta pancreáticas [76]. No obstante, el proceso de muerte celular que sufren las células beta mediante la administración de STZ no sucede mediante un ataque autoinmune

diabetogénico [76], como ocurre en los modelos NOD [76] y RIP-B7.1 [80]. Por tanto, en comparación con los dos modelos experimentales más comunes de diabetes tipo I, el ratón RIP-B7.1 posee atributos más semejantes a la patología humana. Cabe destacar que durante el desarrollo de la presente tesis doctoral se ha descrito que el ratón RIP-B7.1 diabético presenta hiperglucagonemia. La hiperglucagonemia supone una de las características más marcadas de las alteraciones funcionales que sufre la célula alfa en la diabetes autoinmune humana [182] y no está reflejada en todos los modelos de diabetes tipo I, como se detallará a continuación.

En condiciones fisiológicas, la hiperglucemia presenta un efecto inhibitor sobre la célula alfa pancreática y su secreción de glucagón [17]. En cambio, las células alfa responden a estímulos de baja concentración de glucosa secretando esta hormona, con el fin de mantener niveles de glucemia estables mediante la estimulación de la síntesis y movilización de glucosa hepática [17]. Las células alfa de pacientes que sufren DM1 presentan alteraciones en la secreción de glucagón. En esta patología, en condiciones de alta concentración de glucosa las células alfa no suprimen la secreción de glucagón [182], exacerbando la hiperglucemia postprandial. En cambio, en condiciones de baja concentración de glucosa, las células alfa no responden adecuadamente, favoreciendo eventos de hipoglucemia severa [162]. Esta desregulación de la secreción dificulta el tratamiento de la enfermedad y contribuye a los altos niveles de glucemia que sufren estos pacientes [182]. Desafortunadamente, la hiperglucagonemia no está presente en todos los modelos murinos de diabetes tipo I. El modelo más empleado, el ratón NOD, sufre hiperglucagonemia en estado prediabético [193], pero no de forma constante con la evolución de la diabetes [181]. En cambio, tras la administración de STZ se consigue un aumento significativo de glucagón plasmático [194]. No obstante, este modelo no representa el ataque autoinmune diabetogénico que tiene lugar en la DM1 [76]. El ratón RIP-B7.1 desarrolla hiperglucagonemia durante la diabetes autoinmune, en los dos estadios estudiados durante la realización de esta tesis doctoral, mimetizando el fenotipo humano de esta patología. A pesar de que no se conoce la causa unívoca de los altos niveles de glucagón plasmático detectados una y cuatro semanas desde el debut de la diabetes en este modelo, esta desregulación podría estar relacionada con los bajos niveles de insulina plasmática y pancreática descritos en ambos estadios de la patología. Estos bajos niveles producen un estado hipoinsulinémico de forma local en el islote, que alteraría la regulación paracrina que ejerce la insulina sobre las otras células del islote. Estudios previos han demostrado que un ambiente hipoinsulinémico en el islote puede ocasionar la hipersecreción de glucagón [16, 186, 195]. Además, otros estudios sugieren alteraciones del sistema nervioso en la regulación de la secreción de glucagón durante la DM1 [164]. Por ejemplo, se ha observado una pérdida de la innervación en los islotes de Langerhans en modelos de diabetes autoinmune espontánea [172, 173], modelos murinos de EAD [174] y en pacientes humanos [171], que ha sido asociada con

la desregulación funcional de las células alfa, concretamente de su respuesta a condiciones de hipoglucemia [164]. Por tanto, serían necesarios más estudios para comprender los mecanismos que provocan la desregulación de la secreción de las células alfa pancreáticas en el ratón RIP-B7.1. Por todas las características descritas en base al ataque autoinmune y la caracterización fenotípica del ratón RIP-B7.1, se puede concluir que este modelo es adecuado para el estudio de las células alfa pancreáticas en la diabetes autoinmune y presenta ventajas frente a los modelos clásicos de esta patología.

## **V.2. Balance de la masa de la célula alfa pancreática en la diabetes autoinmune experimental.**

La masa de las células endocrinas se adapta en respuesta a distintas situaciones metabólicas con el principal objetivo de satisfacer los niveles hormonales requeridos [86]. Los eventos reguladores más estudiados de la masa endocrina del páncreas son los cambios en el número de células y su tamaño, la tasa de apoptosis y la proliferación celular. En DM1, la investigación de la masa de la célula alfa se ha realizado en distintos estudios con muestras pancreáticas de donantes humanos y en diferentes modelos murinos de esta enfermedad [181, 187-189, 194, 196]. Sin embargo, existe una falta de consenso entre los resultados, así como una ausencia de unificación entre las condiciones experimentales y los estadios de diabetes estudiados. Además, la ausencia de estudios que exploren el conjunto de los procesos que modulan la masa de la célula alfa pancreática en el mismo modelo y condiciones experimentales, ha dificultado la obtención de información acerca de la dinámica de la masa de este tipo celular en la diabetes tipo I.

De hecho, en muchos casos los datos existentes a este respecto son dispares. La masa de la célula alfa no se encuentra alterada con la evolución de la diabetes en el ratón NOD [181], ni tampoco tras la administración de varias dosis bajas de STZ en ratones [194, 196]. En cambio, tras la administración de una única dosis alta de STZ se ha descrito un aumento de la masa de la célula alfa en los animales diabéticos [181]. Como se ha comentado anteriormente, la principal diferencia entre los dos métodos de destrucción de la población beta pancreática mediante la administración de STZ es la aparición de inflamación en el islote al administrarse a bajas dosis, mientras que este proceso está ausente al emplear una única dosis alta del fármaco [76]. Por tanto, el conjunto de estos estudios sugiere que la inflamación del islote evita la expansión de las células alfa, dado que no se han hallado diferencias en la masa de célula alfa en los dos modelos murinos de DM1 que presentan inflamación en los islotes pancreáticos [181, 194, 196], mientras que en un ambiente no inflamatorio la masa de la célula alfa se ve aumentada [181].

En consistencia con esta hipótesis, en el ratón RIP-B7.1 observamos una correlación negativa entre el grado de insulitis y la proporción de células alfa que forman el islote en los animales con diabetes avanzada, mientras que existe una tendencia a esta correlación negativa en la diabetes temprana. La correlación negativa entre el grado de insulitis y glucagón podría implicar que el ambiente inflamatorio y los niveles de insulitis en el ratón RIP-B7.1 están involucrados en la disminución de la masa de la célula alfa observada en la diabetes avanzada, dado que en este estadio los islotes con un grado más severo de insulitis presentan un menor grado de tinción glucagón positiva. La disminución de la masa de la célula alfa también se ha observado en estudios realizados en páncreas de donantes con diabetes tipo I avanzada [188, 189], sugiriendo que la población alfa pancreática sufre una depleción durante el transcurso de la enfermedad. En cambio, en el estadio temprano de diabetes estudiado en el ratón RIP-B7.1, la masa de la célula alfa pancreática se encuentra mantenida, así como el contenido total de glucagón. Estos resultados se encuentran en concordancia con otros estudios realizados en modelos murinos de DM1 que presentan infiltración en los islotes de Langerhans [181, 194, 196] y en donantes con estadios tempranos de DM1 [187].

El estudio de los eventos que modulan el balance de la masa de la célula alfa pancreática en el ratón RIP-B7.1 indican que este tipo celular se encuentra bajo un proceso regenerativo durante los estadios temprano y avanzado de EAD. A pesar de la depleción de la población alfa pancreática que tiene lugar cuatro semanas tras el debut de la diabetes en los ratones RIP-B7.1, se ha observado un aumento en los contribuidores positivos de la masa de este tipo celular. Los ratones RIP-B7.1 diabéticos presentan, en ambos estadios estudiados, un mayor tamaño de la célula alfa o hipertrofia, un aumento en su tasa de proliferación y evidencias de neogénesis a partir del epitelio ductal. Estos resultados indican que la célula alfa se encuentra en un estado activo de renovación celular durante la evolución de la diabetes autoinmune experimental. En este contexto, se han hallado evidencias de renovación de la célula alfa pancreática en donantes humanos, en una investigación en la que se ha observado una tasa de proliferación aumentada en estadios tempranos de la enfermedad [190]. En cambio, en otro estudio con pacientes jóvenes y niños con DM1 se ha observado una reducción en los niveles de proliferación de la célula alfa pancreática [191]. En cuanto a los estudios realizados en modelos animales, se han descrito resultados dispares acerca de la renovación de las células alfa en la DM1. Tras la administración de dosis bajas de STZ se ha observado tanto un aumento de proliferación de células alfa [197] como tasas similares de proliferación [196] en comparación con animales sanos. En cambio, en el ratón NOD se ha descrito una reducción en la tasa de replicación de la célula alfa [181]. Estas diferencias entre estudios señalan la importancia del establecimiento de un consenso en las condiciones experimentales a la hora de investigar la dinámica de la masa de la célula alfa en la DM1.

La generación de nuevas células o neogénesis supone otro contribuidor positivo de la masa celular. En condiciones experimentales y patológicas, la neogénesis de células beta a partir de precursores no endocrinos como el epitelio ductal, parece suponer una fuente potencial de nuevas células beta [86, 183]. Existen indicios de que este mecanismo se podría ver activado durante la progresión de la diabetes tipo I, en la que la proliferación y la neogénesis de la célula beta pancreática se activan como proceso regenerativo de esta población celular con el fin de compensar la pérdida de células beta [86]. No obstante, no se conoce la contribución de la neogénesis a partir del epitelio ductal en el balance de la masa del islote de Langerhans en condiciones fisiológicas, y distintos estudios sostienen que este proceso no participa de forma significativa al balance de la masa endocrina del páncreas en el ratón adulto en condiciones normales [89, 198]. En el caso de la célula alfa pancreática, en los años 90 se sugirió la existencia de un proceso de neogénesis de este tipo celular a partir de precursores no endocrinos en la DM1 [199]. O'Reilly y colaboradores publicaron un estudio en el que se describió la presencia de células positivas para glucagón próximas a los ductos pancreáticos en ratones NOD [199]. Además, se ha observado la presencia de glucagón en células del epitelio ductal en muestras de donantes sanos y con DM1 [200, 201]. Estas observaciones podrían indicar la existencia de mecanismos de neogénesis de célula alfa en la DM1. Por ello, en el presente estudio se evaluó la presencia de la expresión celular conjunta de glucagón y un marcador del epitelio ductal en los ratones RIP-B7.1, como indicador de procesos de neogénesis a partir de este precursor no endocrino. Este análisis reveló un aumento en el porcentaje de células alfa asociadas al epitelio ductal, sugiriendo un proceso de neogénesis de la célula alfa. Por tanto, es posible que esta población celular se encuentre bajo un estado de regeneración, proliferativo y neogénico, en respuesta al ambiente diabetogénico en el ratón RIP-B7.1, de forma similar a los mecanismos activados en las células beta para intentar mantener su masa en la diabetes tipo I [86].

Por último, mientras que todos los procesos que modulan de forma positiva la masa de la célula alfa se encuentran aumentados en el ratón RIP-B7.1 (tamaño celular, proliferación y procesos de neogénesis celular), la tasa de apoptosis observada fue insignificante en la diabetes temprana e incluso nula en las muestras de ratones con diabetes avanzada. La resistencia de la célula alfa a la apoptosis en ambientes diabetogénicos ha sido descrita con anterioridad [202, 203]. Este tipo celular presenta una mayor expresión de las proteínas anti-apoptóticas Bcl2 y Bcl2l1 en comparación con las células beta pancreáticas, aumentando así su probabilidad de supervivencia en condiciones de estrés celular [203]. Esta propiedad intrínseca de la célula alfa junto con la baja tasa de apoptosis observada, podría indicar que la apoptosis no tiene un papel fundamental en la regulación de la masa de este tipo celular durante la diabetes autoinmune experimental. Sin embargo, dado que observamos una disminución en la masa de esta población

cuatro semanas tras el debut de la enfermedad, no podemos descartar que un evento de apoptosis previo a este estadio pueda haber contribuido a la depleción de la población alfa pancreática observada.

En resumen, la modulación de la masa de la célula alfa en el ratón RIP-B7.1 presenta un balance negativo con el transcurso de la patología, desde un inicio donde se mantiene esta población hasta una situación de depleción en un estadio de diabetes avanzada. Esta dinámica sería diferente respecto a la célula beta pancreática, donde se observa una acusada disminución de su masa desde el comienzo de la DM1 [204]. Sin embargo, la ausencia de un aumento de apoptosis de la célula alfa junto a la estimulación de la proliferación celular, neogénesis e hipertrofia de este tipo celular, generan a priori una situación paradójica, ya que argumentan en favor de un aumento de la masa de la célula alfa pancreática. Puesto que lo que observamos es una disminución de la misma durante la evolución de la diabetes en los ratones RIP-B7.1, estos resultados sugieren la presencia probable de otros mecanismos celulares en la regulación de la masa de este tipo celular capaces de generar una disminución en la misma. En este contexto, la conversión espontánea de células alfa en células beta mediante un mecanismo conocido como transdiferenciación celular podría estar involucrada, como se discutirá en el siguiente apartado.

### **V.3. Posible contribución de los procesos de transdiferenciación celular en el balance de la masa de la célula alfa pancreática durante el desarrollo natural de EAD.**

Tras la ablación de las células beta en ratón, se ha descrito una reprogramación espontánea de las células alfa con el fin de transformarse en células beta, conocida como transdiferenciación celular [87, 101]. Este mecanismo supone una importante ruta de regeneración de células beta pancreáticas en modelos murinos transgénicos de ablación de la población beta pancreática. En estos estudios se ha confirmado que las nuevas células beta provienen de células alfa o delta gracias a un marcador que indica la progenie de estos tipos celulares y que persiste en las células beta regeneradas [87, 180, 205]. Esta tecnología se conoce como “cell tracing”, un marcaje genético irreversible que ha supuesto un gran avance en la comprensión del desarrollo y de los procesos de transdiferenciación celular de las células del islote de Langerhans [87, 206]. Esta técnica ha permitido confirmar que la reprogramación de células alfa a beta se lleva a cabo mediante un intermediario bi-hormonal que expresa las hormonas características de ambas células, insulina y glucagón [87, 180]. La presencia de estas células bi-hormonales también se ha descrito en el ratón NOD [181, 192] y en muestras de donantes con DM1 [180, 207], asociándose a un proceso de transdiferenciación de células alfa a

beta en condiciones de ablación de la población beta pancreática. En consonancia con estos estudios, hemos observado un alto porcentaje de células que expresan ambas hormonas en el ratón RIP-B7.1 tanto en diabetes temprana como avanzada.

El modelo empleado para la realización de esta tesis doctoral no está dotado de la tecnología “cell tracing”, por lo que resulta difícil determinar con seguridad el origen unívoco de las células bi-hormonales y las posibles células beta regeneradas mediante transdiferenciación. No obstante, la hipótesis de transdiferenciación de las células alfa es la más consistente con los datos existentes, ya que tras la ablación de la población beta-pancreática se generan células betas a través de un intermediario bi-hormonal [87, 180], aspecto que se sustenta además con los datos de expresión del factor de transcripción Pdx1, como comentaremos posteriormente. Sin embargo, existen otros procesos que podrían implicar la presencia de células bi-hormonales y que podrían suceder en la diabetes autoinmune experimental: la dediferenciación de las células alfa pancreáticas a un estadio celular menos diferenciado, o una transdiferenciación de las células beta a alfa como mecanismo de defensa contra el ataque autoinmune. Se ha postulado la existencia de procesos de dediferenciación de las células beta pancreáticas a un estado de precursor celular durante la diabetes tipo II y como consecuencia al estrés celular [208]. Este mecanismo se ha propuesto como un factor que podría participar en la pérdida de la masa de la célula beta pancreática y como una vía de escape de la muerte celular en la diabetes tipo II [208]. No obstante, en modelos murinos de dediferenciación de células beta, no se han detectado células con expresión conjunta de insulina y glucagón, que pudieran indicar una implicación de este intermediario bi-hormonal en la dediferenciación de células endocrinas [209], por lo que esta hipótesis no se sustentaría en el contexto de nuestro modelo. Asimismo, se ha descrito que la conversión de células beta humanas primarias a células alfa no transcurre mediante un intermediario bi-hormonal [210]. También cabe destacar que las células beta pancreáticas no se transforman espontáneamente en células alfa tras la ablación casi completa de la población alfa pancreática en modelos murinos [156]. Estos estudios junto a los mencionados anteriormente en los que la ablación de la población beta pancreática activa la transdiferenciación de las células alfa [87, 180], indican que la reprogramación de células alfa a beta es probablemente el proceso prevalente tras la ablación de la población beta pancreática y que puede asociarse a la presencia de células bi-hormonales.

Además de la observación del aumento de células bi-hormonales en el ratón RIP-B7.1 diabético, durante el desarrollo de la presente investigación también detectamos un alto porcentaje de células glucagón positivas con expresión de Pdx1. Este factor de transcripción se expresa en células inmaduras durante el desarrollo pancreático y específicamente en células beta maduras, considerándose un marcador de identidad de las células beta pancreáticas [88]. La presencia de células alfa que expresan Pdx1 se ha descrito en modelos experimentales de



ablación de la población beta pancreática [87, 101, 180] y en pacientes con DM1 [211, 212]. Los cambios de expresión de factores de transcripción en células alfa han sido asociados por distintos estudios con procesos de pérdida de identidad, regeneración y transdiferenciación celular, como se detalla a continuación.

Los factores de transcripción Arx y Dmmt1 constituyen dos de los principales marcadores de identidad de la célula alfa pancreática. En muestras de donantes humanos con DM1, se ha observado una pérdida de expresión de ambos en las células alfa [211, 213], así como un aumento de la expresión del factor de transcripción Nkx6.1 en este tipo celular, siendo específico de células beta pancreáticas [213]. La expresión de factores de transcripción específicos de células beta, como Pax4, en células alfa ha sido asociada a la activación de neogénesis de células alfa a partir de precursores no endocrinos [214]. Este fenómeno también se ha observado tras la inactivación del factor de transcripción Arx en células alfa de ratón [215]. En ambos estudios, se induce la transdiferenciación de células alfa a beta, además de producirse un aumento de la neogénesis de células alfa a partir del epitelio ductal pancreático [214, 215]. Estos resultados indican que la pérdida de identidad de la célula alfa y la expresión forzada en este tipo celular de factores de transcripción específicos de células beta, pueden desencadenar procesos de neogénesis y transdiferenciación de células alfa.

Este proceso de transdiferenciación asociado a la expresión de factores de transcripción también ha sido descrito en ratones NOD, en islotes humanos tratados con STZ y modelos murinos transgénicos, en los que la expresión forzada en células alfa de los factores de transcripción Pdx1 y MAFA, específicos de células beta, es capaz de inducir la transformación de estas células en células beta pancreáticas [216, 217]. Además, estos dos factores de transcripción han sido empleados en un estudio reciente, en el que se ha observado cómo la expresión de Pdx1 y MafA mediante vectores adenovirales en células alfa humanas re-agregadas, produce la reprogramación de las mismas y la obtención de características de la célula beta, como la expresión y secreción de insulina [62]. Por otra parte, se han observado cambios de forma espontánea en los patrones de expresión de factores de transcripción que definen la identidad de los distintos tipos celulares del islote, en modelos de ablación de la población beta pancreática [87, 101] y en muestras humanas [211-213]. En conjunto, estas investigaciones indican que la expresión génica de factores de transcripción está comprometida en las células alfa durante la DM1 y que la expresión forzada de factores de transcripción clave propios de las células beta pancreáticas en células alfa, puede inducir la reprogramación de las mismas y la obtención de características de las células beta pancreáticas. Varios estudios han relacionado la presencia de células bi-hormonales y la expresión de Pdx1 en células glucagón positivas con la reprogramación de células alfa a beta en islotes humanos, ratones NOD y modelos de ablación de la población beta pancreática [87, 101, 180, 211, 212]. Por tanto, todas



estas evidencias conjuntamente con los resultados de nuestro estudio, sugieren que la expresión de Pdx1 en células glucagón positivas y la presencia de células bi-hormonales en el ratón RIP-B7.1 durante el transcurso de la diabetes autoinmune experimental, señala hacia la existencia de procesos de reprogramación de las células alfa pancreáticas.

La transdiferenciación de las células alfa a células beta en el ratón RIP-B7.1 diabético podría tener implicaciones en el balance de la masa de este tipo celular. Nuestros datos indican que la transformación de células alfa a células beta es un proceso que sucede durante el transcurso natural de EAD en el ratón RIP-B7.1 y que podría contribuir a largo plazo en la disminución de la masa de la célula alfa pancreática observada cuatro semanas tras el debut de la diabetes. Esta disminución podría deberse a la dificultad de repoblar las células beta en un ambiente autoinmune diabetogénico. Existen evidencias de que las células beta nuevas son más vulnerables a la muerte celular mediada por citoquinas [218]. Por ello, la capacidad de las células alfa para repoblar la población beta pancreática podría verse dificultada, y ocasionar la disminución observada en la masa de la célula alfa ante la continua regeneración de la población beta pancreática. A pesar de que los procesos de regeneración de células alfa se encuentran aumentados en nuestro modelo, parece no ser suficiente para mantener la homeostasis de la masa de este tipo celular, que sufre una clara disminución en la diabetes avanzada.

En este contexto, el aumento en los procesos que regulan la regeneración de la población alfa pancreática podría ser una respuesta compensatoria a la pérdida de células alfa funcionales con el fin de mantener la población alfa pancreática y su función. Igualmente, nuestros hallazgos también indican que el aumento en la regeneración de las células alfa observado en EAD podría asociarse con el mantenimiento de la población alfa pancreática para su posterior transformación en células beta. En consonancia con nuestros resultados, la pérdida de identidad de las células alfa induce tanto su transformación en células beta como la activación de neogénesis de células alfa a partir del epitelio ductal [215], como se ha detallado anteriormente.

A pesar de que la conversión de células alfa a beta se ha descrito en diferentes modelos murinos de EAD [87, 101, 178-180] y varias investigaciones han descrito la presencia de células glucagón e insulina positivas, o células que expresan glucagón y Pdx1 en muestras de donantes con DM1 [180, 207, 212], otros estudios no han observado estas células doble positivas en páncreas de donantes con esta patología [213, 219]. Es posible que esta diferencia entre los estudios resida en que los procesos de transdiferenciación de células alfa a beta puedan depender de variables como la edad del donante, la duración y edad del inicio de la diabetes, entre otras condiciones, como sugieren los resultados obtenidos en distintos modelos murinos [178, 205] y en muestras de donantes [211, 213]. También se ha observado que la frecuencia de

transdiferenciación de células endocrinas puede modularse según el tiempo tras la ablación de la población beta pancreática y la edad de los animales [205].

En este contexto, en un estudio reciente que emplea el modelo murino RIP-B7.1, no se ha observado un aumento en el porcentaje de células doble positivas para insulina y glucagón, cuando se analizó este parámetro ocho semanas tras la inmunización de los animales [220]. Sin embargo, es importante mencionar que las condiciones de EAD empleadas en el estudio de Cobo-Vuilleumier y colaboradores fueron diferentes a las escogidas para realizar la presente tesis. El citado estudio se centra en el proceso autoinmune, empleando animales cuatro y ocho semanas tras la administración de la vacuna de ADN, lo que implicó una incidencia de diabetes en los animales inmunizados del 50 y 80%, respectivamente [220]. Sin embargo, en la presente tesis, todos los animales que se emplearon fueron diabéticos, teniendo en cuenta el momento de debut de diabetes: una y cuatro semanas tras el inicio de la enfermedad. En nuestro caso, el grupo de animales diabéticos en un estadio temprano involucra un periodo de inmunización de 3 a 7 semanas, mientras que el grupo de diabetes avanzada supuso un periodo de inmunización de 7 a 15 semanas tras la administración de la vacuna. Por tanto, es difícil comparar ambos estudios dado que los animales se encontraron en distintos estadios de inmunización y de diabetes, lo que puede desembocar en distintos resultados, como se ha mencionado anteriormente. Nuestros resultados, en los que todos los animales fueron diabéticos, son consistentes con diferentes estudios en modelos murinos de DM1 y en muestras de donantes humanos con DM1, los cuales muestran un incremento en células bi-hormonales [87, 178, 207, 211]. Además de la ausencia de un aumento de células bi-hormonales, Cobo-Vuilleumier y colaboradores mostraron una reducción de la masa de la célula alfa pancreática cuatro semanas tras la inmunización en ratones RIP-B7.1 [220]. Dado que la infiltración de los islotes de Langerhans en ratones RIP-B7.1 puede detectarse dos semanas tras la inmunización [80], es posible que el ataque autoinmune module la masa de la célula alfa antes del debut sintomatológico de la enfermedad. Por tanto, las condiciones experimentales, el estadio de diabetes y los tiempos de inmunización estudiados, entre otros factores, parecen ser fundamentales para analizar la homeostasis de la masa de la célula alfa pancreática en EAD, dado que la masa de la célula alfa y los procesos involucrados en su regulación son dinámicos y presentan una alta plasticidad durante el transcurso de la diabetes autoinmune experimental.

En resumen, en la presente tesis doctoral se muestra que la población alfa pancreática está preservada en un estadio temprano de diabetes autoinmune, en contraste con la situación de las células beta pancreáticas en estas condiciones [185]. Sin embargo, al estudiar un estadio avanzado de diabetes, observamos una disminución de la masa de la célula alfa pancreática. En ambos estadios, temprano y avanzado, varios procesos involucrados en el control de la masa de las células del islote, como el tamaño celular, la proliferación y la neogénesis a partir del

epitelio ductal, se encuentran regulados al alza, mientras que detectamos bajos niveles de apoptosis. Además, el incremento de la presencia de células bi-hormonales que expresan insulina y glucagón de forma conjunta, así como células alfa con expresión de Pdx1, sugiere un proceso de transformación de células alfa a beta. Por tanto, la presente tesis evidencia que, en la diabetes autoinmune experimental, las células alfa se encuentran bajo un intenso proceso regenerativo con el fin de mantener su propia masa y/o crear una reserva celular capaz de regenerar la población beta pancreática. Nuestros resultados también sostienen que las células alfa pancreáticas presentan una gran capacidad para adaptarse a la diabetes autoinmune experimental y esta plasticidad puede ser usada como aproximación terapéutica para la regeneración de células beta en la diabetes tipo I.







Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

## **VI. CONCLUSIONES**



## VI. CONCLUSIONES

1. El modelo murino de diabetes autoinmune experimental RIP-B7.1, supone un modelo idóneo para el estudio de la población alfa pancreática, con características muy similares a la DM1 humana como insulinitis, destrucción autoinmune de la población beta pancreática, hiperglucemia, hipoinsulinemia e hiperglucagonemia.
2. El modelo RIP-B7.1 presenta hiperglucagonemia tras el debut de la diabetes conjuntamente con hipoinsulinemia y una disminución del contenido de insulina pancreático. Este fenotipo se mantiene durante la fase avanzada de diabetes. Sin embargo, si bien se preserva el contenido pancreático de glucagón tras el debut de la diabetes, se observa una disminución del mismo en fases avanzadas.
3. La masa de la célula alfa pancreática no presenta alteraciones significativas en un estadio temprano de diabetes en el ratón RIP-B7.1, al contrario de lo que ocurre con la población beta pancreática.
4. La masa de la célula alfa pancreática disminuye en la diabetes avanzada del ratón RIP-B7.1, en paralelo a una disminución crítica de la célula beta.
5. Los procesos de renovación celular de la célula alfa pancreática que incluyen proliferación y neogénesis a partir del epitelio ductal se encuentran aumentados durante el inicio y el transcurso natural de la diabetes autoinmune experimental.
6. La célula alfa pancreática sufre hipertrofia durante el transcurso de la diabetes autoinmune experimental, posiblemente como mecanismo compensatorio a la pérdida de masa celular.
7. Estos estudios sugieren que el mantenimiento de la masa de la célula alfa al inicio de la diabetes, así como su menor disminución respecto a la población beta pancreática en estadios avanzados pueden favorecer una alta relación glucagón/insulina que promovería la hiperglucemia en T1D.
8. La presencia de células alfa expresando insulina o PDX1 está incrementada en los animales diabéticos tanto en la fase inicial como avanzada, sugiriendo un proceso de transformación de las células alfa a células beta de forma espontánea durante el transcurso de la diabetes.
9. Las células alfa pancreáticas se encuentran, por tanto, en un estado de alta plasticidad durante la diabetes autoinmune experimental.
10. Los datos descritos en la presente tesis apuntan a que la población alfa pancreática se encuentra bajo un intenso proceso regenerativo con el fin de mantener su propia masa y/o crear una reserva celular capaz de regenerar la población beta pancreática.







Biblioteca  
UNIVERSITAS Miguel Hernández

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



## VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Dolensek, J., M.S. Rupnik, and A. Stozer, *Structural similarities and differences between the human and the mouse pancreas*. *Islets*, 2015. **7**(1): p. e1024405.
2. Bosco, D., et al., *Unique Arrangement of  $\alpha$ - and  $\beta$ -Cells in Human Islets of Langerhans*. 2010.
3. In't Veld, P. and M. Marichal, *Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **654**: p. 1-19.
4. Paul, L., *Beiträge zur mikroskopischen Anatomie der Bauchspeicheldrüse : Inaugural-Dissertaton, zur Erlangung der Doctorwürde in der Medicin und Chirurgie vorgelegt der Medicinischen Facultät der Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin*. 1869.
5. Zanone, M.M., E. Favaro, and G. Camussi, *From endothelial to beta cells: insights into pancreatic islet microendothelium*. *Curr Diabetes Rev*, 2008. **4**(1): p. 1-9.
6. Ballian, N. and F.C. Brunnicardi, *Islet vasculature as a regulator of endocrine pancreas function*. *World J Surg*, 2007. **31**(4): p. 705-14.
7. Rodriguez-Diaz, R., et al., *AUTONOMIC AXONS IN THE HUMAN ENDOCRINE PANCREAS SHOW UNIQUE INNERVATION PATTERNS*. *Cell Metab*, 2011. **14**(1): p. 45-54.
8. Cabrera, O., et al., *The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function*. 2006.
9. Orci, L. and R.H. Unger, *Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells*. *Lancet*, 1975. **2**(7947): p. 1243-4.
10. Erlandsen, S.L., et al., *Pancreatic islet cell hormones distribution of cell types in the islet and evidence for the presence of somatostatin and gastrin within the D cell*. *J Histochem Cytochem*, 1976. **24**(7): p. 883-97.
11. Brissova, M., et al., *Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy*. *J Histochem Cytochem*, 2005. **53**(9): p. 1087-97.
12. Kilimnik, G., et al., *Quantification of islet size and architecture*. *Islets*, 2012. **4**(2): p. 167-72.
13. Bonner-Weir, S. and T.D. O'Brien, *Islets in Type 2 Diabetes: In Honor of Dr. Robert C. Turner*. 2008.
14. Bosco, D., L. Orci, and P. Meda, *Homologous but not heterologous contact increases the insulin secretion of individual pancreatic B-cells*. *Exp Cell Res*, 1989. **184**(1): p. 72-80.
15. Hædersdal, S., et al., *The Role of Glucagon in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes*. *Mayo Clin Proc*, 2018. **93**(2): p. 217-239.
16. Marroqui, L., et al., *Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes*. *Nutr Res Rev*, 2014. **27**(1): p. 48-62.
17. Quesada, I., et al., *Physiology of the pancreatic alpha-cell and glucagon secretion: role in glucose homeostasis and diabetes*. *J Endocrinol*, 2008. **199**(1): p. 5-19.

18. Patterson, C.C., et al., *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. Lancet, 2009. **373**(9680): p. 2027-33.
19. Maahs, D.M., et al., *Epidemiology of type 1 diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2010. **39**(3): p. 481-97.
20. Atkinson, M.A., G.S. Eisenbarth, and A.W. Michels, *Type 1 diabetes*. Lancet, 2014. **383**(9911): p. 69-82.
21. Association, A.D., *Standards of Medical Care in Diabetes*. 2017, Diabetes Care. p. S1-135.
22. Morran, M.P., et al., *Immunogenetics of type 1 diabetes mellitus*. Mol Aspects Med, 2015. **42**: p. 42-60.
23. Lorenzen, T., et al., *Long-term risk of IDDM in first-degree relatives of patients with IDDM*. Diabetologia, 1994. **37**(3): p. 321-7.
24. Redondo, M.J., et al., *Genetic determination of islet cell autoimmunity in monozygotic twin, dizygotic twin, and non-twin siblings of patients with type 1 diabetes: prospective twin study*. Bmj, 1999. **318**(7185): p. 698-702.
25. Todd, J.A., J.I. Bell, and H.O. McDevitt, *HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 599-604.
26. Todd, J.A., *Etiology of type 1 diabetes*. Immunity, 2010. **32**(4): p. 457-67.
27. Bell, G.I., S. Horita, and J.H. Karam, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(2): p. 176-83.
28. Ueda, H., et al., *Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease*. Nature, 2003. **423**(6939): p. 506-11.
29. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type 1 diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 337-8.
30. Lowe, C.E., et al., *Large-scale genetic fine mapping and genotype-phenotype associations implicate polymorphism in the IL2RA region in type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(9): p. 1074-82.
31. Concannon, P., et al., *A human type 1 diabetes susceptibility locus maps to chromosome 21q22.3*. Diabetes, 2008. **57**(10): p. 2858-61.
32. Concannon, P., S.S. Rich, and G.T. Nepom, *Genetics of type 1A diabetes*. N Engl J Med, 2009. **360**(16): p. 1646-54.
33. Gianani, R. and G.S. Eisenbarth, *The stages of type 1A diabetes: 2005*. Immunol Rev, 2005. **204**: p. 232-49.
34. Imagawa, A. and T. Hanafusa, *Fulminant type 1 diabetes--an important subtype in East Asia*. Diabetes Metab Res Rev, 2011. **27**(8): p. 959-64.

35. Oikarinen, S., et al., *Virus antibody survey in different European populations indicates risk association between coxsackievirus B1 and type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2014. **63**(2): p. 655-62.
36. Yang, Y. and P. Santamaria, *Dissecting autoimmune diabetes through genetic manipulation of non-obese diabetic mice*. *Diabetologia*, 2003. **46**(11): p. 1447-64.
37. Op de Beeck, A. and D.L. Eizirik, *Viral infections in type 1 diabetes mellitus--why the beta cells?* *Nat Rev Endocrinol*, 2016. **12**(5): p. 263-273.
38. Virtanen, S.M., et al., *Early introduction of dairy products associated with increased risk of IDDM in Finnish children. The Childhood in Diabetes in Finland Study Group*. *Diabetes*, 1993. **42**(12): p. 1786-90.
39. Svoren, B.M., et al., *Significant vitamin D deficiency in youth with type 1 diabetes mellitus*. *J Pediatr*, 2009. **154**(1): p. 132-4.
40. Blanton, D., et al., *Reduced serum vitamin D-binding protein levels are associated with type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2011. **60**(10): p. 2566-70.
41. Cooper, J.D., et al., *Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2011. **60**(5): p. 1624-31.
42. Keenan, H.A., et al., *Residual insulin production and pancreatic  $\beta$ -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study*. *Diabetes*, 2010. **59**(11): p. 2846-53.
43. Insel, R.A., et al., *Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association*. *Diabetes Care*, 2015. **38**(10): p. 1964-74.
44. Feutren, G., et al., *Cyclosporin increases the rate and length of remissions in insulin-dependent diabetes of recent onset. Results of a multicentre double-blind trial*. *Lancet*, 1986. **2**(8499): p. 119-24.
45. Willcox, A., et al., *Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes*. *Clin Exp Immunol*, 2009. **155**(2): p. 173-81.
46. Kassem, S.A., et al., *Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy*. *Diabetes*, 2000. **49**(8): p. 1325-33.
47. Mathis, D., L. Vence, and C. Benoist, *beta-Cell death during progression to diabetes*. *Nature*, 2001. **414**(6865): p. 792-8.
48. Magnuson, A.M., et al., *Population dynamics of islet-infiltrating cells in autoimmune diabetes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(5): p. 1511-6.
49. Allen, J.S., et al., *Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture*. *Diabetes*, 2009. **58**(1): p. 138-45.
50. Lehuen, A., et al., *Immune cell crosstalk in type 1 diabetes*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(7): p. 501-13.
51. Coppieters, K.T., et al., *Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients*. *J Exp Med*, 2012. **209**(1): p. 51-60.

52. Ziegler, A.G. and G.T. Nepom, *Prediction and pathogenesis in type 1 diabetes*. *Immunity*, 2010. **32**(4): p. 468-78.
53. Copenhaver, M. and R.P. Hoffman, *Type 1 diabetes: where are we in 2017?* *Transl Pediatr*, 2017. **6**(4): p. 359-364.
54. Shapiro, A.M., et al., *Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen*. *N Engl J Med*, 2000. **343**(4): p. 230-8.
55. Shapiro, A.M., et al., *International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(13): p. 1318-30.
56. Ricordi, C. and T.B. Strom, *Clinical islet transplantation: advances and immunological challenges*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(4): p. 259-68.
57. de Kort, H., et al., *Islet transplantation in type 1 diabetes*. *Bmj*, 2011. **342**: p. d217.
58. Agarwal, A. and K.L. Brayman, *Update on islet cell transplantation for type 1 diabetes*. *Semin Intervent Radiol*, 2012. **29**(2): p. 90-8.
59. Pagliuca, F.W., et al., *Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro*. *Cell*, 2014. **159**(2): p. 428-39.
60. Manzar, G.S., E.M. Kim, and N. Zavazava, *Demethylation of induced pluripotent stem cells from type 1 diabetic patients enhances differentiation into functional pancreatic beta cells*. *J Biol Chem*, 2017. **292**(34): p. 14066-14079.
61. Richardson, T., et al., *Capsule stiffness regulates the efficiency of pancreatic differentiation of human embryonic stem cells*. *Acta Biomater*, 2016. **35**: p. 153-65.
62. Furuyama, K., et al., *Diabetes relief in mice by glucose-sensing insulin-secreting human alpha-cells*. *Nature*, 2019. **567**(7746): p. 43-48.
63. Oldstone, M.B., et al., *Virus infection triggers insulin-dependent diabetes mellitus in a transgenic model: role of anti-self (virus) immune response*. *Cell*, 1991. **65**(2): p. 319-31.
64. Guerder, S., et al., *Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(11): p. 5138-42.
65. Hanafusa, T., et al., *The NOD mouse*. *Diabetes Res Clin Pract*, 1994. **24 Suppl**: p. S307-11.
66. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 447-85.
67. Santamaria, P., *The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes*. *Immunity*, 2010. **32**(4): p. 437-45.
68. In't Veld, P., *Insulinitis in human type 1 diabetes: a comparison between patients and animal models*. *Semin Immunopathol*, 2014. **36**(5): p. 569-79.
69. Wicker, L.S., et al., *Genetic control of diabetes and insulinitis in the nonobese diabetic (NOD) mouse*. *J Exp Med*, 1987. **165**(6): p. 1639-54.

70. Fitzpatrick, F., et al., *Influence of castration, alone or combined with thymectomy, on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse*. *Endocrinology*, 1991. **129**(3): p. 1382-90.
71. Fox, H.S., *Androgen treatment prevents diabetes in nonobese diabetic mice*. *J Exp Med*, 1992. **175**(5): p. 1409-12.
72. Makino, S., et al., *Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse*. *Jikken Dobutsu*, 1981. **30**(2): p. 137-40.
73. Beeson, P.B., *Age and sex associations of 40 autoimmune diseases*. *Am J Med*, 1994. **96**(5): p. 457-62.
74. Amur, S., A. Parekh, and P. Mummaneni, *Sex differences and genomics in autoimmune diseases*. *J Autoimmun*, 2012. **38**(2-3): p. J254-65.
75. Lenzen, S., *The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes*. *Diabetologia*, 2008. **51**(2): p. 216-26.
76. King, A.J., *The use of animal models in diabetes research*. *Br J Pharmacol*, 2012. **166**(3): p. 877-94.
77. Honeyman, M.C., et al., *Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2000. **49**(8): p. 1319-24.
78. von Herrath, M.G., et al., *Using transgenic mouse models to dissect the pathogenesis of virus-induced autoimmune disorders of the islets of Langerhans and the central nervous system*. *Immunol Rev*, 1996. **152**: p. 111-43.
79. Rajasalu, T., et al., *Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity*, in *Ann N Y Acad Sci*. 2004: United States. p. 208-15.
80. Karges, W., et al., *The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune diabetes model in RIP-B7.1 mice*. *Eur J Immunol*, 2007. **37**(8): p. 2097-103.
81. Kromann, H., et al., *The influence of the major histocompatibility complex (H-2) on experimental diabetes in mice*. *Diabetologia*, 1979. **16**(2): p. 107-14.
82. Karges, W., et al., *Induction of autoimmune diabetes through insulin (but not GAD65) DNA vaccination in nonobese diabetic and in RIP-B7.1 mice*. *Diabetes*, 2002. **51**(11): p. 3237-44.
83. Pechhold, K., et al., *Beta cell-specific CD80 (B7-1) expression disrupts tissue protection from autoantigen-specific CTL-mediated diabetes*. *J Autoimmun*, 2003. **20**(1): p. 1-13.
84. von Herrath, M.G., et al., *Coexpression of B7-1 and viral ("self") transgenes in pancreatic beta cells can break peripheral ignorance and lead to spontaneous autoimmune diabetes*. *Immunity*, 1995. **3**(6): p. 727-38.
85. Kutzler, M.A. and D.B. Weiner, *DNA vaccines: ready for prime time?* *Nature Reviews Genetics*, 2008. **9**(10): p. 776-788.



86. Mezza, T. and R.N. Kulkarni, *The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass*. Diabetologia, 2014. **57**(7): p. 1291-303.
87. Thorel, F., et al., *Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss*, in *Nature*. 2010: England. p. 1149-54.
88. van der Meulen, T. and M.O. Huising, *The role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells*. J Mol Endocrinol, 2015. **54**(2): p. R103-17.
89. Dor, Y., et al., *Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation*. Nature, 2004. **429**(6987): p. 41-6.
90. Teta, M., et al., *Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice*. Diabetes, 2005. **54**(9): p. 2557-67.
91. Maedler, K., et al., *Aging correlates with decreased beta-cell proliferative capacity and enhanced sensitivity to apoptosis: a potential role for Fas and pancreatic duodenal homeobox-1*. Diabetes, 2006. **55**(9): p. 2455-62.
92. Karnik, S.K., et al., *Menin controls growth of pancreatic beta-cells in pregnant mice and promotes gestational diabetes mellitus*. Science, 2007. **318**(5851): p. 806-9.
93. Brelje, T.C., et al., *Beneficial effects of lipids and prolactin on insulin secretion and beta-cell proliferation: a role for lipids in the adaptation of islets to pregnancy*. J Endocrinol, 2008. **197**(2): p. 265-76.
94. Davis, D.B., et al., *FoxM1 is up-regulated by obesity and stimulates beta-cell proliferation*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(9): p. 1822-34.
95. Nir, T., D.A. Melton, and Y. Dor, *Recovery from diabetes in mice by beta cell regeneration*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2553-61.
96. Xu, X., et al., *Beta cells can be generated from endogenous progenitors in injured adult mouse pancreas*. Cell, 2008. **132**(2): p. 197-207.
97. Lee, S.H., E. Hao, and F. Levine, *beta-Cell replication and islet neogenesis following partial pancreatectomy*. Islets, 2011. **3**(4): p. 188-95.
98. Merino, B., et al., *Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity*, in *Sci Rep*. 2015. **5**, p. 11622.
99. Ellingsgaard, H., et al., *Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 13163-8.
100. Zhang, Y., et al., *Regeneration of pancreatic non-beta endocrine cells in adult mice following a single diabetes-inducing dose of streptozotocin*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e36675.
101. Chung, C.H., et al., *Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells*. Stem Cells, 2010. **28**(9): p. 1630-8.
102. Meier, J.J., et al., *Beta-cell replication is the primary mechanism subserving the postnatal expansion of beta-cell mass in humans*. Diabetes, 2008. **57**(6): p. 1584-94.



103. Basu, R., et al., *Mechanisms of the age-associated deterioration in glucose tolerance: contribution of alterations in insulin secretion, action, and clearance*. *Diabetes*, 2003. **52**(7): p. 1738-48.
104. Butler, A.E., et al., *Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2003. **52**(1): p. 102-10.
105. Butler, A.E., et al., *Adaptive changes in pancreatic beta cell fractional area and beta cell turnover in human pregnancy*. *Diabetologia*, 2010. **53**(10): p. 2167-76.
106. Wang, R.N., G. Kloppel, and L. Bouwens, *Duct- to islet-cell differentiation and islet growth in the pancreas of duct-ligated adult rats*. *Diabetologia*, 1995. **38**(12): p. 1405-11.
107. Van de Casteele, M., et al., *Neurogenin 3+ cells contribute to beta-cell neogenesis and proliferation in injured adult mouse pancreas*. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e523.
108. Ackermann Misfeldt, A., R.H. Costa, and M. Gannon, *Beta-cell proliferation, but not neogenesis, following 60% partial pancreatectomy is impaired in the absence of FoxM1*. *Diabetes*, 2008. **57**(11): p. 3069-77.
109. Bonner-Weir, S., et al., *A second pathway for regeneration of adult exocrine and endocrine pancreas. A possible recapitulation of embryonic development*. *Diabetes*, 1993. **42**(12): p. 1715-20.
110. Waguri, M., et al., *Demonstration of two different processes of beta-cell regeneration in a new diabetic mouse model induced by selective perfusion of alloxan*. *Diabetes*, 1997. **46**(8): p. 1281-90.
111. Reers, C., et al., *Impaired islet turnover in human donor pancreata with aging*. *Eur J Endocrinol*, 2009. **160**(2): p. 185-91.
112. Gregg, B.E., et al., *Formation of a human beta-cell population within pancreatic islets is set early in life*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012. **97**(9): p. 3197-206.
113. Leonardi, O., G. Mints, and M.A. Hussain, *Beta-cell apoptosis in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus*. *Eur J Endocrinol*, 2003. **149**(2): p. 99-102.
114. Curtin, J.F. and T.G. Cotter, *Live and let die: regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis*. *Cell Signal*, 2003. **15**(11): p. 983-92.
115. Gibson, G.E. and H.M. Huang, *Mitochondrial enzymes and endoplasmic reticulum calcium stores as targets of oxidative stress in neurodegenerative diseases*. *J Bioenerg Biomembr*, 2004. **36**(4): p. 335-40.
116. Schroder, M. and R.J. Kaufman, *ER stress and the unfolded protein response*. *Mutat Res*, 2005. **569**(1-2): p. 29-63.
117. Kaiser, N., G. Leibowitz, and R. Neshler, *Glucotoxicity and beta-cell failure in type 2 diabetes mellitus*. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2003. **16**(1): p. 5-22.
118. Del Guerra, S., et al., *Functional and molecular defects of pancreatic islets in human type 2 diabetes*. *Diabetes*, 2005. **54**(3): p. 727-35.
119. Welsh, N., et al., *Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets?* *Diabetes*, 2005. **54**(11): p. 3238-44.

120. Maedler, K., et al., *Glucose-induced beta cell production of IL-1beta contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 851-60.
121. Atkinson, M.A. and G.S. Eisenbarth, *Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment*. Lancet, 2001. **358**(9277): p. 221-9.
122. Rabinovitch, A. and W.L. Suarez-Pinzon, *Roles of cytokines in the pathogenesis and therapy of type 1 diabetes*. Cell Biochem Biophys, 2007. **48**(2-3): p. 159-63.
123. Maedler, K. and M.Y. Donath, *Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass*. Horm Res, 2004. **62 Suppl 3**: p. 67-73.
124. Maedler, K., et al., *Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets*. Diabetes, 2001. **50**(8): p. 1683-90.
125. Harding, H.P. and D. Ron, *Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review*. Diabetes, 2002. **51 Suppl 3**: p. S455-61.
126. Marchetti, P., et al., *The endoplasmic reticulum in pancreatic beta cells of type 2 diabetes patients*. Diabetologia, 2007. **50**(12): p. 2486-94.
127. Maedler, K., et al., *Leptin modulates beta cell expression of IL-1 receptor antagonist and release of IL-1beta in human islets*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(21): p. 8138-43.
128. Moin, A.S.M. and A.E. Butler, *Alterations in Beta Cell Identity in Type 1 and Type 2 Diabetes*. Curr Diab Rep, 2019. **19**(9): p. 83.
129. Slack, J.M. and D. Tosh, *Transdifferentiation and metaplasia--switching cell types*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 581-6.
130. Cohen, D.E. and D. Melton, *Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine*. Nat Rev Genet, 2011. **12**(4): p. 243-52.
131. Jopling, C., S. Boue, and J.C. Izpisua Belmonte, *Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(2): p. 79-89.
132. Chera, S., et al., *Diabetes Recovery By Age-Dependent Conversion of Pancreatic  $\delta$ -Cells Into Insulin Producers*. Nature, 2014. **514**(7523): p. 503-7.
133. Yoneda, S., et al., *Predominance of beta-cell neogenesis rather than replication in humans with an impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2013. **98**(5): p. 2053-61.
134. Butler, A.E., et al., *Marked expansion of exocrine and endocrine pancreas with incretin therapy in humans with increased exocrine pancreas dysplasia and the potential for glucagon-producing neuroendocrine tumors*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2595-604.
135. White, M.G., et al., *Expression of mesenchymal and alpha-cell phenotypic markers in islet beta-cells in recently diagnosed diabetes*. Diabetes Care, 2013. **36**(11): p. 3818-20.
136. Raskin, P. and R.H. Unger, *Hyperglucagonemia and its suppression. Importance in the metabolic control of diabetes*. N Engl J Med, 1978. **299**(9): p. 433-6.
137. Dinneen, S., et al., *Failure of glucagon suppression contributes to postprandial hyperglycaemia in IDDM*. Diabetologia, 1995. **38**(3): p. 337-43.

138. Woerle, H.J., et al., *Mechanisms for abnormal postprandial glucose metabolism in type 2 diabetes*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **290**(1): p. E67-E77.
139. Baron, A.D., et al., *Role of hyperglucagonemia in maintenance of increased rates of hepatic glucose output in type II diabetics*. Diabetes, 1987. **36**(3): p. 274-83.
140. Muller, W.A., et al., *Abnormal alpha-cell function in diabetes. Response to carbohydrate and protein ingestion*. N Engl J Med, 1970. **283**(3): p. 109-15.
141. Cooperberg, B.A. and P.E. Cryer, *Beta-cell-mediated signaling predominates over direct alpha-cell signaling in the regulation of glucagon secretion in humans*. Diabetes Care, 2009. **32**(12): p. 2275-80.
142. Brown, R.J., N. Sinaii, and K.I. Rother, *Too much glucagon, too little insulin: time course of pancreatic islet dysfunction in new-onset type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2008. **31**(7): p. 1403-4.
143. Greenbaum, C.J., R.L. Prigeon, and D.A. D'Alessio, *Impaired beta-cell function, incretin effect, and glucagon suppression in patients with type 1 diabetes who have normal fasting glucose*. Diabetes, 2002. **51**(4): p. 951-7.
144. Porksen, S., et al., *Meal-stimulated glucagon release is associated with postprandial blood glucose level and does not interfere with glycemic control in children and adolescents with new-onset type 1 diabetes*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(8): p. 2910-6.
145. Unger, R.H. and L. Orci, *The essential role of glucagon in the pathogenesis of diabetes mellitus*. Lancet, 1975. **1**(7897): p. 14-6.
146. Barnes, A.J., et al., *Ketoacidosis in pancreatectomized man*. N Engl J Med, 1977. **296**(22): p. 1250-3.
147. Holst, J.J., *Extrapancreatic glucagons*. Digestion, 1978. **17**(2): p. 168-90.
148. Ravazzola, M., R.H. Unger, and L. Orci, *Demonstration of glucagon in the stomach of human fetuses*. Diabetes, 1981. **30**(10): p. 879-82.
149. Lund, A., et al., *Evidence of Extrapancreatic Glucagon Secretion in Man*. Diabetes, 2016. **65**(3): p. 585-97.
150. Brand, C.L., et al., *Evidence for a major role for glucagon in regulation of plasma glucose in conscious, nondiabetic, and alloxan-induced diabetic rabbits*. Diabetes, 1996. **45**(8): p. 1076-83.
151. Brand, C.L., et al., *Immunoneutralization of endogenous glucagon with monoclonal glucagon antibody normalizes hyperglycaemia in moderately streptozotocin-diabetic rats*. Diabetologia, 1994. **37**(10): p. 985-93.
152. Parker, J.C., et al., *Glycemic control in mice with targeted disruption of the glucagon receptor gene*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(2): p. 839-43.
153. Gelling, R.W., et al., *Lower blood glucose, hyperglucagonemia, and pancreatic alpha cell hyperplasia in glucagon receptor knockout mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 1438-43.
154. Lee, Y., et al., *Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice*. Diabetes, 2011. **60**(2): p. 391-7.

155. Lee, Y., et al., *Metabolic manifestations of insulin deficiency do not occur without glucagon action*, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012: United States. p. 14972-6.
156. Thorel, F., et al., *Normal glucagon signaling and beta-cell function after near-total alpha-cell ablation in adult mice*. *Diabetes*, 2011. **60**(11): p. 2872-82.
157. Steenberg, V.R., et al., *Acute disruption of glucagon secretion or action does not improve glucose tolerance in an insulin-deficient mouse model of diabetes*. *Diabetologia*, 2016. **59**(2): p. 363-70.
158. Damond, N., et al., *Blockade of glucagon signaling prevents or reverses diabetes onset only if residual  $\beta$ -cells persist*. *Elife*, 2016. **5**.
159. Scheen, A.J., N. Paquot, and P.J. Lefèbvre, *Investigational glucagon receptor antagonists in Phase I and II clinical trials for diabetes*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2017. **26**(12): p. 1373-1389.
160. Pettus, J., et al., *Effect of a glucagon receptor antibody (REMD-477) in type 1 diabetes: A randomized controlled trial*. *Diabetes Obes Metab*, 2018. **20**(5): p. 1302-1305.
161. Siafarikas, A., et al., *Early loss of the glucagon response to hypoglycemia in adolescents with type 1 diabetes*. *Diabetes Care*, 2012. **35**(8): p. 1757-62.
162. Cryer, P.E., *Hypoglycaemia: the limiting factor in the glycaemic management of Type I and Type II diabetes*. *Diabetologia*, 2002. **45**(7): p. 937-48.
163. Gerich, J.E., et al., *Lack of glucagon response to hypoglycemia in diabetes: evidence for an intrinsic pancreatic alpha cell defect*. *Science*, 1973. **182**(4108): p. 171-3.
164. Taborsky, G.J., Jr., et al., *The search for the mechanism of early sympathetic islet neuropathy in autoimmune diabetes*. *Diabetes Obes Metab*, 2014. **16 Suppl 1**: p. 96-101.
165. Brunnicardi, F.C., D.M. Shavelle, and D.K. Andersen, *Neural regulation of the endocrine pancreas*. *Int J Pancreatol*, 1995. **18**(3): p. 177-95.
166. Ahrén, B., G.J. Taborsky, and D. Porte, *Neuropeptidergic versus cholinergic and adrenergic regulation of islet hormone secretion*. *Diabetologia*, 1986. **29**(12): p. 827-36.
167. Ahrén, B., *Autonomic regulation of islet hormone secretion--implications for health and disease*. *Diabetologia*, 2000. **43**(4): p. 393-410.
168. Marliss, E.B., et al., *Glucagon release induced by pancreatic nerve stimulation in the dog*. *J Clin Invest*, 1973. **52**(5): p. 1246-59.
169. Porte, D., et al., *The effect of epinephrine on immunoreactive insulin levels in man*. *J Clin Invest*, 1966. **45**(2): p. 228-36.
170. Unger, R.H. and L. Orci, *Role of glucagon in diabetes*. *Arch Intern Med*, 1977. **137**(4): p. 482-91.
171. Munding, T.O., et al., *Human Type 1 Diabetes Is Characterized by an Early, Marked, Sustained, and Islet-Selective Loss of Sympathetic Nerves*. *Diabetes*, 2016. **65**(8): p. 2322-30.
172. Persson-Sjogren, S., D. Holmberg, and S. Forsgren, *Remodeling of the innervation of pancreatic islets accompanies insulinitis preceding onset of diabetes in the NOD mouse*. *J Neuroimmunol*, 2005. **158**(1-2): p. 128-37.

173. Mei, Q., et al., *Early, selective, and marked loss of sympathetic nerves from the islets of BioBreeder diabetic rats*. *Diabetes*, 2002. **51**(10): p. 2997-3002.
174. Taborsky, G.J., et al., *The p75 neurotrophin receptor is required for the major loss of sympathetic nerves from islets under autoimmune attack*. *Diabetes*, 2014. **63**(7): p. 2369-79.
175. Montanya, E. and N. Tellez, *Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size*. *Methods Mol Biol*, 2009. **560**: p. 137-58.
176. Conchello, J.A. and J.W. Lichtman, *Optical sectioning microscopy*. *Nat Methods*, 2005. **2**(12): p. 920-31.
177. Tellez, N. and E. Montanya, *Gastrin induces ductal cell dedifferentiation and beta-cell neogenesis after 90% pancreatectomy*. *J Endocrinol*, 2014. **223**(1): p. 67-78.
178. Cigliola, V., et al., *Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothed-mediated signalling modulate identity changes of glucagon(+) alpha-cells*. *Nat Cell Biol*, 2018. **20**(11): p. 1267-1277.
179. Bi, X., et al., *omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity*. *J Clin Invest*, 2017. **127**(5): p. 1757-1771.
180. Piran, R., et al., *Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type 1 diabetes*. *Cell Death Dis*, 2014. **5**: p. e1357.
181. Plesner, A., *Islet remodeling in female mice with spontaneous autoimmune and streptozotocin-induced diabetes*. *PLoS One*, 2014. **9**(8): p. e102843.
182. Cryer, P.E., *Minireview: Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes*. *Endocrinology*, 2012. **153**(3): p. 1039-48.
183. Bonner-Weir, S., et al., *Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story*. *Diabetes*, 2010. **59**(10): p. 2340-8.
184. Bramswig, N.C., et al., *Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(3): p. 1275-84.
185. Rowe, P.A., et al., *The pancreas in human type 1 diabetes*. *Semin Immunopathol*, 2011. **33**(1): p. 29-43.
186. Gaisano, H.Y., P.E. MacDonald, and M. Vranic, *Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes*. *Front Physiol*, 2012. **3**.
187. Sayama, K., et al., *Pancreatic beta and alpha cells are both decreased in patients with fulminant type 1 diabetes: a morphometrical assessment*. *Diabetologia*, 2005. **48**(8): p. 1560-4.
188. Waguri, M., et al., *Histopathologic study of the pancreas shows a characteristic lymphocytic infiltration in Japanese patients with IDDM*. *Endocr J*, 1997. **44**(1): p. 23-33.
189. Bonnet-Serrano, F., et al., *Decreased alpha-cell mass and early structural alterations of the exocrine pancreas in patients with type 1 diabetes: An analysis based on the nPOD repository*. *PLoS One*, 2018. **13**(1): p. e0191528.
190. Willcox, A., et al., *Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes*. *Diabetologia*, 2010. **53**(9): p. 2020-8.



191. Lam, C.J., et al., *Highly Proliferative alpha-Cell-Related Islet Endocrine Cells in Human Pancreata*. *Diabetes*, 2018. **67**(4): p. 674-686.
192. Reddy, S., et al., *Presence of residual beta cells and co-existing islet autoimmunity in the NOD mouse during longstanding diabetes: a combined histochemical and immunohistochemical study*. *J Mol Histol*, 2008. **39**(1): p. 25-36.
193. Homo-Delarche, F., *Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes?* *Braz J Med Biol Res*, 2001. **34**(4): p. 437-47.
194. Huang, Y.C., et al., *In situ electrophysiological examination of pancreatic alpha cells in the streptozotocin-induced diabetes model, revealing the cellular basis of glucagon hypersecretion*. *Diabetes*, 2013. **62**(2): p. 519-30.
195. Xu, E., et al., *Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system*. *Cell Metab*, 2006. **3**(1): p. 47-58.
196. Meier, J.J., et al., *Diminished glucagon suppression after beta-cell reduction is due to impaired alpha-cell function rather than an expansion of alpha-cell mass*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**(4): p. E717-23.
197. Takeda, Y., et al., *Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice*. *Diabetologia*, 2012. **55**(2): p. 404-12.
198. Solar, M., et al., *Pancreatic exocrine duct cells give rise to insulin-producing beta cells during embryogenesis but not after birth*. *Dev Cell*, 2009. **17**(6): p. 849-60.
199. O'Reilly, L.A., et al., *alpha-Cell neogenesis in an animal model of IDDM*. *Diabetes*, 1997. **46**(4): p. 599-606.
200. Martin-Pagola, A., et al., *Insulin protein and proliferation in ductal cells in the transplanted pancreas of patients with type 1 diabetes and recurrence of autoimmunity*. *Diabetologia*, 2008. **51**(10): p. 1803-13.
201. Carpino, G., et al., *Progenitor cell niches in the human pancreatic duct system and associated pancreatic duct glands: an anatomical and immunophenotyping study*. *J Anat*, 2016. **228**(3): p. 474-86.
202. Marroqui, L., et al., *Differential cell autonomous responses determine the outcome of coxsackievirus infections in murine pancreatic alpha and beta cells*. *Elife*, 2015. **4**: p. e06990.
203. Marroqui, L., et al., *Pancreatic alpha Cells are Resistant to Metabolic Stress-induced Apoptosis in Type 2 Diabetes*. *EBioMedicine*, 2015. **2**(5): p. 378-85.
204. Mellado-Gil, J.M., et al., *PAX4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2016. **59**(4): p. 755-65.
205. Chera, S., et al., *Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers*. *Nature*, 2014. **514**(7523): p. 503-7.
206. Herrera, P.L., V. Nepote, and A. Delacour, *Pancreatic cell lineage analyses in mice*. *Endocrine*, 2002. **19**(3): p. 267-78.

207. Lam, C.J., et al., *Low Level Insulin Content Within Abundant Non-Beta Islet Endocrine Cells in Long-Standing Type 1 Diabetes*. Diabetes, 2018.
208. Bensellam, M., J.C. Jonas, and D.R. Laybutt, *Mechanisms of beta-cell dedifferentiation in diabetes: recent findings and future research directions*. J Endocrinol, 2018. **236**(2): p. R109-r143.
209. Talchai, C., et al., *Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1223-34.
210. Spijker, H.S., et al., *Conversion of Mature Human  $\beta$ -Cells Into Glucagon-Producing  $\alpha$ -Cells*. Diabetes, 2013. **62**(7): p. 2471-80.
211. Chakravarthy, H., et al., *Converting Adult Pancreatic Islet  $\alpha$  Cells into  $\beta$  Cells by Targeting Both *Dnmt1* and *Arx**. Cell Metab, 2017. **25**(3): p. 622-634.
212. Peter, S., et al., *Characterization of the endocrine pancreas in Type 1 Diabetes: islet size is maintained but islet number is markedly reduced*. bioRxiv, 2018.
213. Brissova, M., et al., *alpha Cell Function and Gene Expression Are Compromised in Type 1 Diabetes*. Cell Rep, 2018. **22**(10): p. 2667-2676.
214. Collombat, P., et al., *The ectopic expression of Pax4 in the mouse pancreas converts progenitor cells into alpha and subsequently beta cells*. Cell, 2009. **138**(3): p. 449-62.
215. Courtney, M., et al., *The inactivation of Arx in pancreatic  $\alpha$ -cells triggers their neogenesis and conversion into functional  $\beta$ -like cells*. PLoS Genet, 2013. **9**(10): p. e1003934.
216. Xiao, X., et al., *Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes*. Cell Stem Cell, 2018. **22**(1): p. 78-90.e4.
217. Matsuoka, T.A., et al., *Mafa Enables Pdx1 to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet alpha-Cells Into beta-Cells In Vivo*. Diabetes, 2017. **66**(5): p. 1293-1300.
218. Meier, J.J., et al., *Increased vulnerability of newly forming beta cells to cytokine-induced cell death*. Diabetologia, 2006. **49**(1): p. 83-9.
219. Lam, C.J., et al., *beta Cells Persist in T1D Pancreata Without Evidence of Ongoing beta-Cell Turnover or Neogenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2017. **102**(8): p. 2647-2659.
220. Cobo-Vuilleumier, N., et al., *LRH-1 agonism favours an immune-islet dialogue which protects against diabetes mellitus*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1488.







## **ANEXO I**



# SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

## Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model of experimental autoimmune diabetes

Received: 24 January 2019  
Accepted: 14 June 2019  
Published online: 02 July 2019

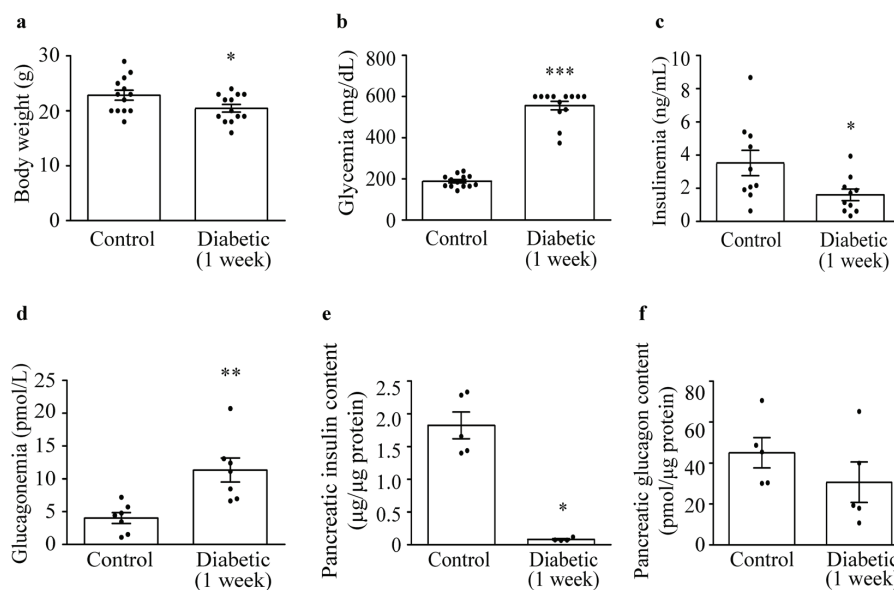
Eva Bru-Tari<sup>1,2</sup>, Nadia Cobo-Vuilleumier<sup>3</sup>, Paloma Alonso-Magdalena<sup>1,2</sup>, Reinaldo S. Dos Santos<sup>1,2</sup>, Laura Marroqui<sup>1,2</sup>, Angel Nadal<sup>1,2</sup>, Benoit R. Gauthier<sup>2,3</sup> & Ivan Quesada<sup>1,2</sup>

Most studies in type 1 diabetes (T1D) have focused on the loss of the pancreatic beta-cell population. However, despite the involvement of the alpha-cell in the aetiology and complications of T1D, little is known about the regulation of the pancreatic alpha-cell mass in this disease. The need for a better understanding of this process is further emphasized by recent findings suggesting that alpha-cells may constitute a potential reservoir for beta-cell regeneration. In this study, we characterized the pancreatic alpha-cell mass and its regulatory processes in the transgenic RIP-B7.1 mice model of experimental autoimmune diabetes (EAD). Diabetic mice presented insulinitis, hyperglycaemia, hypoinsulinemia and hyperglucagonemia along with lower pancreatic insulin content. While alpha-cell mass and pancreatic glucagon content were preserved at the early-onset of EAD, both parameters were reduced in the advanced phase. At both stages, alpha-cell size, proliferation and ductal neogenesis were up-regulated, whereas apoptosis was almost negligible. Interestingly, we found an increase in the proportion of glucagon-containing cells positive for insulin or the beta-cell transcription factor PDX1. Our findings suggest that pancreatic alpha-cell renewal mechanisms are boosted during the natural course of EAD, possibly as an attempt to maintain the alpha-cell population and/or to increase beta-cell regeneration via alpha-cell transdifferentiation.

Type 1 diabetes (T1D) is characterized by the autoimmune destruction of the pancreatic beta-cell population and the consequent decrease or lack of insulin secretion<sup>1</sup>. While the pancreatic beta-cell function, death and regeneration in T1D has been intensively studied<sup>1</sup>, the pancreatic alpha-cell changes and adaptations in this pathology remain poorly understood. Pancreatic alpha-cells have a key role in the regulation of glycaemia: glucagon secretion from these cells triggers hepatic glucose release and, ultimately, prevents hypoglycaemia<sup>2,3</sup>. Conversely, hyperglucagonemia is frequently found in animal models of T1D and diabetic patients, which has been related with impaired glucagon secretion and/or altered cell morphology<sup>2-9</sup>. In this pathological context of insulin deficit, increased plasma glucagon levels contribute to diabetic hyperglycaemia by increasing hepatic glucose output<sup>9</sup>. Indeed, the pancreatic alpha-cell function and mass are potential targets of therapeutic strategies in diabetes<sup>2,3,10,11</sup>. Several experimental and clinical studies are aimed at limiting glucagon secretion and/or action to ameliorate the condition of hyperglycaemia in diabetes by decreasing hepatic glucose output<sup>2,11</sup>. Additionally, it has been also proposed that pancreatic alpha-cells could be a source for beta-cell regeneration in type 1 diabetes<sup>10</sup>.

Despite scarcity of information, analysis of human pancreata has shown that the alpha-cell mass is commonly preserved in recent-onset T1D patients<sup>12</sup>, while it seems to be reduced in long-standing T1D subjects<sup>13,14</sup>. Although the few existing data suggest that human alpha-cells undergo a highly dynamic state during disease progression<sup>15-17</sup>, the regulation of the alpha-cell mass in T1D is largely unknown. Due to limitations of human samples, murine models are indispensable surrogates to study T1D pathology. Nonetheless, pending on the mouse

<sup>1</sup>Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDIBE), IBMC, Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain. <sup>2</sup>Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Madrid, Spain. <sup>3</sup>Department of Cell Regeneration and Advanced Therapies, Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine-CABIMER, Junta de Andalucía-University of Pablo de Olavide-University of Seville-CSIC, Seville, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to I.Q. (email: [ivanq@umh.es](mailto:ivanq@umh.es))



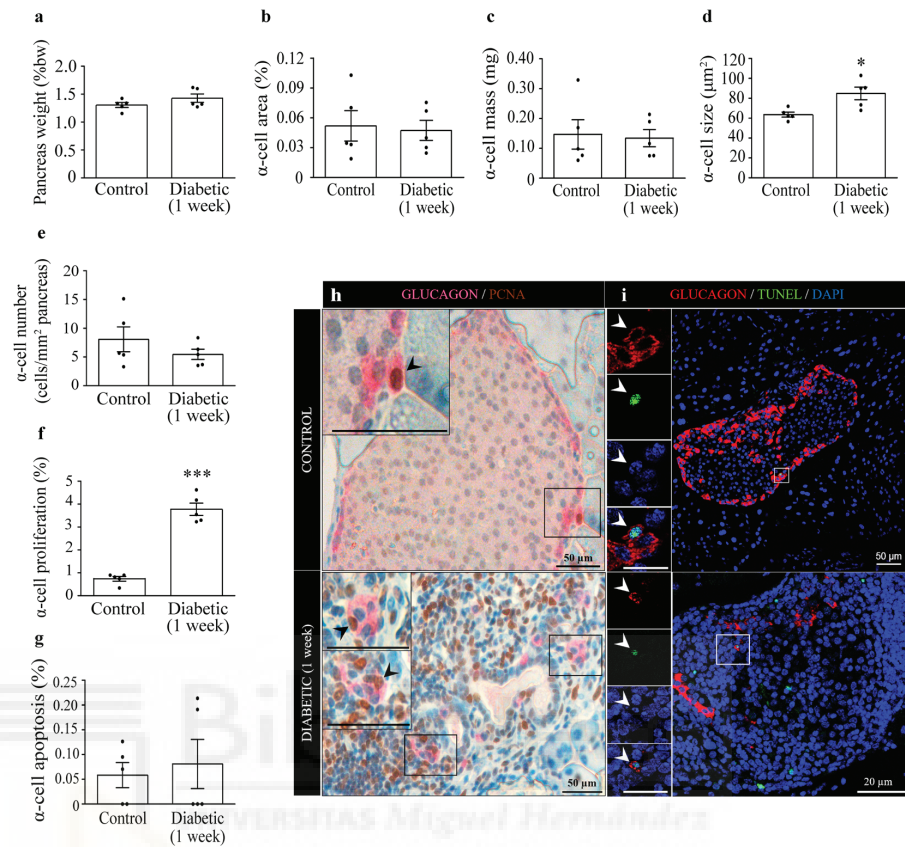
**Figure 1.** Glycaemia and hormone levels in RIP-B7.1 mice one week after diabetes onset. (a) Body weight ( $n = 13$  for each group). (b) RIP-B7.1 mice showed hyperglycemia in non-fasting state one week after diabetes onset ( $n = 13$  for each group). (c) Diabetic mice presented hypoinsulinemia ( $n = 10$  for each group) and (d) hyperglucagonemia ( $n = 7$  for each group) compared with controls. Plasma hormonal measurements were performed in non-fasting state. (e) Pancreatic insulin content normalized by total pancreatic protein content (control  $n = 5$ , diabetic  $n = 4$ ). (f) Pancreatic glucagon content normalized by total pancreatic protein content ( $n = 5$  for each group). Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test (a,d,f), Mann-Whitney test (b,c,e). Statistical significance is indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

model, different outcomes have been reported regarding the status of the alpha-cell mass and its regulatory processes involved. It has been shown that the alpha-cell mass is unchanged in the autoimmune Non-Obese Diabetic (NOD) mice<sup>18</sup> as well as in mice treated with multiple low-dose of streptozotocin (STZ)<sup>6,19</sup>, a chemical-induced diabetic model that develops insulinitis<sup>20</sup>. In contrast, another study reported increased alpha-cell area in this latter animal model<sup>8</sup>. These discrepancies might be partly due to differences in the timing and/or diabetes periods that were explored, since T1D involves a progression through several stages<sup>21</sup>. Thus, it would be important to analyse alpha-cell mass and the processes involved in its regulation during key time points of the T1D history in the same diabetic model. These data could provide valuable information to understand the forces involved in the alpha-cell mass dynamics during T1D. The latter is of high actuality in view of recent findings that alpha-to-beta cell trans-differentiation appears to be one of the main mechanisms of beta-cell regeneration<sup>16,22–24</sup>. Additionally, given the involvement of the alpha-cell in the aetiology of T1D and its complications<sup>2,3,9</sup>, a better knowledge about the potential changes in the alpha-cell mass could offer more information about the role of these cells in this disease.

To circumvent caveats associated with either the NOD or STZ mouse model, we opted for the RIP-B7.1 mouse model of experimental autoimmune diabetes (EAD) to study alpha-cell mass in the early-onset and an advanced stage of diabetes. Similar to human T1D<sup>1</sup>, the specific autoimmune destruction of beta-cells in the RIP-B7.1 mouse is mainly driven by CD8<sup>+</sup> T-cells<sup>25</sup>. In contrast, the autoimmune attack in NOD mice is mainly accomplished by both CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T-cells<sup>1</sup>, with CD4<sup>+</sup> T-cell being the predominant subpopulation at diabetes onset<sup>26</sup>. NOD mice may also experience distinctive diseases related to their autoimmune susceptibility that are unlikely to occur in humans<sup>20</sup>, while the EAD-inducible model does not present this limitation<sup>27</sup>. Moreover, T1D models based on STZ-induced beta-cell death do not faithfully recapitulate the autoimmune process against beta-cells characteristic of this pathology and can involve side-effects in multiple organs<sup>20</sup>. Additionally, the diabetic phenotype in the RIP-B7.1 transgenic mice occurs with equal incidence and timing in both sexes in a common mice background, reducing the problem of autoimmune susceptibility genes<sup>27</sup>. Our findings using this stringent EAD model indicate that the alpha-cell population is under an intense attempt of regeneration during the natural course of T1D.

## Results

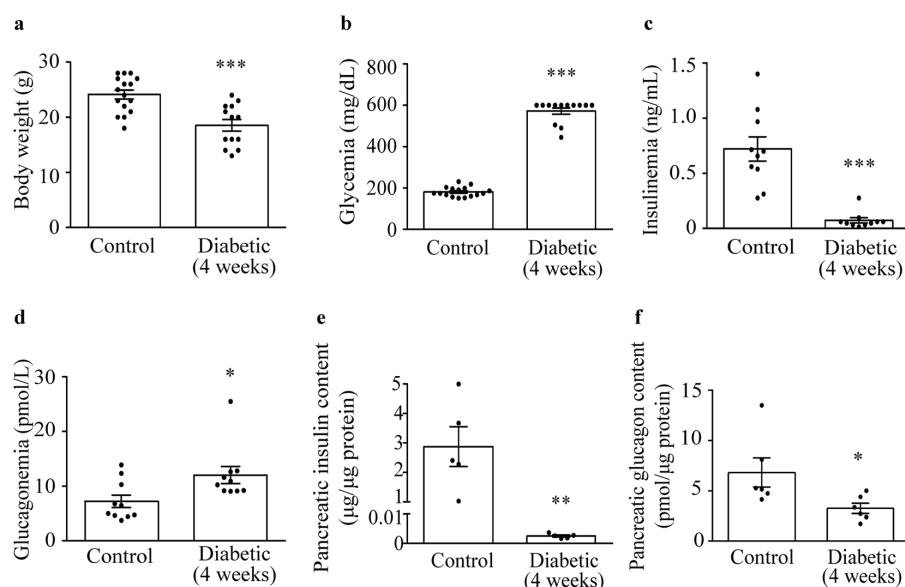
**Plasma and pancreatic hormone levels are altered one week after diabetes onset.** As a result of a beta-cell specific autoimmune attack and destruction, RIP-B7.1 mice develop insulinitis, hyperglycaemia and diabetes<sup>25,27,28</sup>. In our study, about 85% of the total immunized animals presented hyperglycaemia after vaccination with preproinsulin (Supplemental Fig. 1). One week after hyperglycaemia onset, diabetic RIP-B7.1 mice featured a lower body weight compared with controls (Fig. 1a). In non-fasting state, diabetic animals were hyperglycaemic



**Figure 2.** Pancreatic alpha-cell mass, alpha-cell size, proliferation and apoptosis in RIP-B7.1 mice one week after diabetes onset. (a) Pancreas weight as percentage of body weight. (b) Alpha-cell area expressed as the percentage of the glucagon-positive area over the total pancreatic area. (c) Alpha-cell mass. (d) Alpha-cell size. (e) Alpha-cell number per pancreatic area. (f) Alpha-cell proliferation rate: percentage of glucagon and PCNA double-positive cells respect to glucagon-positive cells. (g) Apoptosis rate: percentage of glucagon and TUNEL double-positive cells respect to glucagon-positive cells. (h) Representative images depicting proliferating alpha-cells. Left panels are enlargements of boxed areas (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ). Black arrows indicate PCNA (brown) and glucagon (pink) double-positive cells. (i) Representative images of apoptotic alpha-cells in control and diabetic mice. Left panels are enlargements of boxed areas (scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ). White arrows indicate TUNEL (green) and glucagon (red) double-positive cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). N = 5 mice per condition and group in each experiment. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test (a–f), Mann-Whitney test (g). Statistical significance is indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

(Fig. 1b) and presented an important decrease in plasma insulin levels (Fig. 1c) accompanied with hyperglucagonemia (Fig. 1d), which are characteristic in T1D<sup>5,9</sup>. We next assessed the hormonal content in the whole pancreas. As expected, pancreatic insulin content was severely decreased in diabetic mice (Fig. 1e). In contrast, pancreatic glucagon content did not significantly change (Fig. 1f).

**Pancreatic alpha-cell mass is preserved one week after diabetes onset.** One week after EAD onset, both groups showed similar pancreas weight with respect to the corresponding body weight (Fig. 2a). Islets from diabetic mice exhibited different grades of insulinitis (Supplementary Fig. 2a,b). No significant correlation was found between the insulinitis grade in each islet and the percentage of islet area occupied by glucagon-positive cells (Pearson's  $r = -0.7839$ ,  $p = 0.11$ ; Supplementary Fig. 2c). We found no differences in alpha-cell area and mass between both groups (Fig. 2b,c). The alpha-cell mass was probably compensated in part by the hypertrophy found in these cells (Fig. 2d), since the relative number of alpha-cells tended to decrease in the diabetic animals (Fig. 2e). Additionally, diabetic mice presented a substantial increase in the number of proliferating alpha-cells compared with controls (Fig. 2f,h), while their apoptotic rate was very low and did not change between both groups (Fig. 2g,i). As expected, the beta cell population was drastically reduced within pancreatic islets of diabetic mice (Supplementary Fig. 3a,c), correlating with the hyperglycaemic state, lower plasma and pancreatic insulin



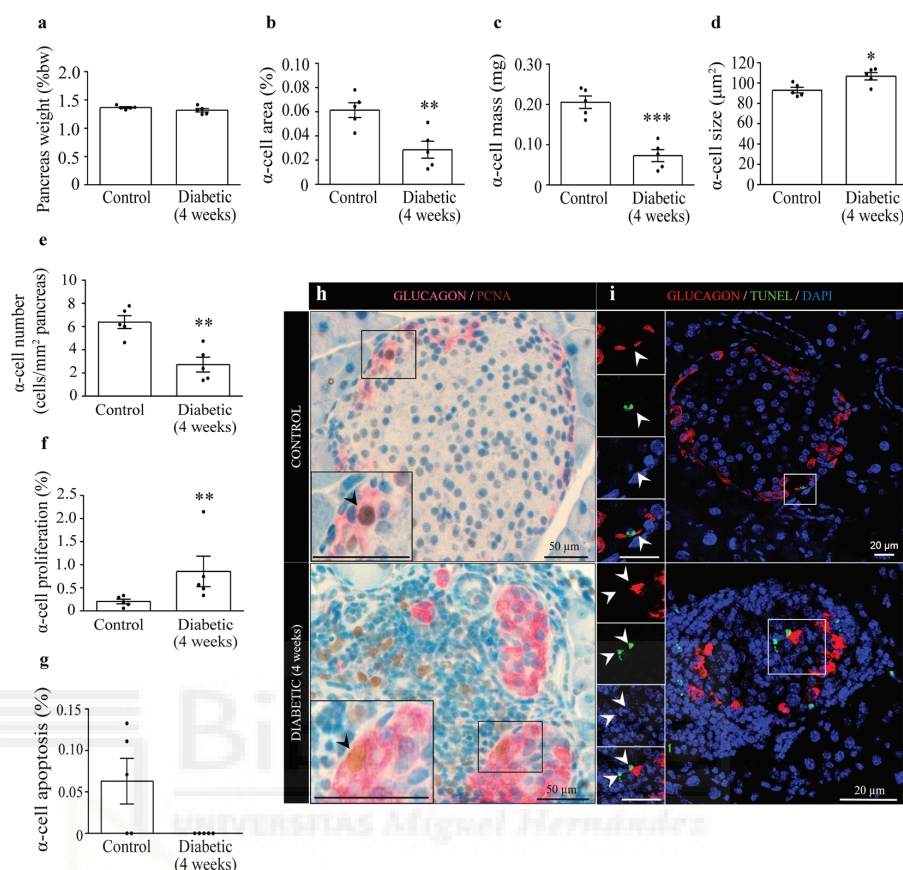
**Figure 3.** Glycaemia and hormone levels in RIP-B.7.1 mice four weeks after diabetes onset. (a) Body weight (control  $n = 16$ , diabetic  $n = 13$ ). (b) Glycaemia measured in non-fasting state (control  $n = 16$ , diabetic  $n = 13$ ). Four-week diabetic mice presented hypoinsulinemia (c) and hyperglucagonemia (d) in non-fasting state ( $n = 10$  for each group). (e) Pancreatic insulin ( $n = 5$  for each group) and (f) glucagon ( $n = 6$  for each group) contents were decreased in diabetic mice. Both parameters were normalized by total pancreatic protein content. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test (a), Mann-Whitney test (b–f). Statistical significance is indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

levels and insulinitis found in these animals (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2). Our results are in agreement with previous reports using this beta-cell specific autoimmune model<sup>25,27–29</sup>.

**Plasma and pancreatic hormone levels are altered after four weeks of EAD.** To analyse alpha-cell mass in advanced stages of EAD, we studied RIP-B7.1 animals at four weeks after hyperglycaemia onset. At this stage, diabetic mice also presented a lower body weight compared with controls (Fig. 3a). Similarly to the situation described for the early-onset stage, glycaemic values were highly increased, while both plasma and pancreatic insulin levels were severely reduced (Fig. 3b,c,e). Moreover, hyperglucagonemia was still present (Fig. 3d), while total pancreatic glucagon content exhibited a reduction in diabetic mice (Fig. 3f).

**Pancreatic alpha-cell mass is decreased four weeks after EAD onset.** We next evaluated the alpha-cell mass in four-week diabetic mice. No changes in the pancreatic weight respect to the body weight were found in the diabetic animals compared with controls (Fig. 4a). Diabetic mice also presented islet infiltration at the advanced phase of the disease (Supplementary Fig. 2a,d), and exhibited a higher insulinitis degree compared with the early-onset stage (Supplementary Fig. 2a,b). A significant inverse correlation was found between the insulinitis grade in each islet and the percentage of islet area occupied by glucagon-positive cells (Pearson's  $r = -0.9745$ ,  $p < 0.01$ ; Supplementary Fig. 2e). Interestingly, the pancreatic alpha-cell area and mass (Fig. 4b,c) as well as the relative number of alpha-cells (Fig. 4e) were significantly decreased in the pancreas from four-week diabetic mice. Moreover, similarly to the situation found at early-onset, the alpha-cell size and proliferating rate (Fig. 4d,f,h) were elevated at the advanced stage. Alpha-cell apoptosis was very low in controls and no apoptotic events were found in diabetic mice (Fig. 4g,i). At this stage, the beta-cell population was largely reduced in diabetic mice (Supplementary Fig. 3b,c).

**Diabetic mice present glucagon-expressing cells in the ductal epithelium.** In both stages, one and four weeks after EAD onset, we observed the presence of glucagon-positive cells near or within the pancreatic ducts from diabetic mice, while these cells were infrequent in control animals (Fig. 5a,b). In light of this observation, and since neogenesis from pancreatic ductal epithelium could be a potential contributor to the endocrine cell mass<sup>30–32</sup>, we assessed the presence of alpha-cells that could derive from ductal epithelia by analysis of those cells that were positive for both cytokeratin (pan-CK) and glucagon. Interestingly, there was an increased percentage of cells positive for both markers in one-week diabetic animals (Fig. 5c,d; Supplementary Fig. 4a), suggesting a process of cell renewal from the ducts. The presence of these double-positive cells persisted four weeks after diabetes onset (Fig. 5e,f; Supplementary Fig. 4b).



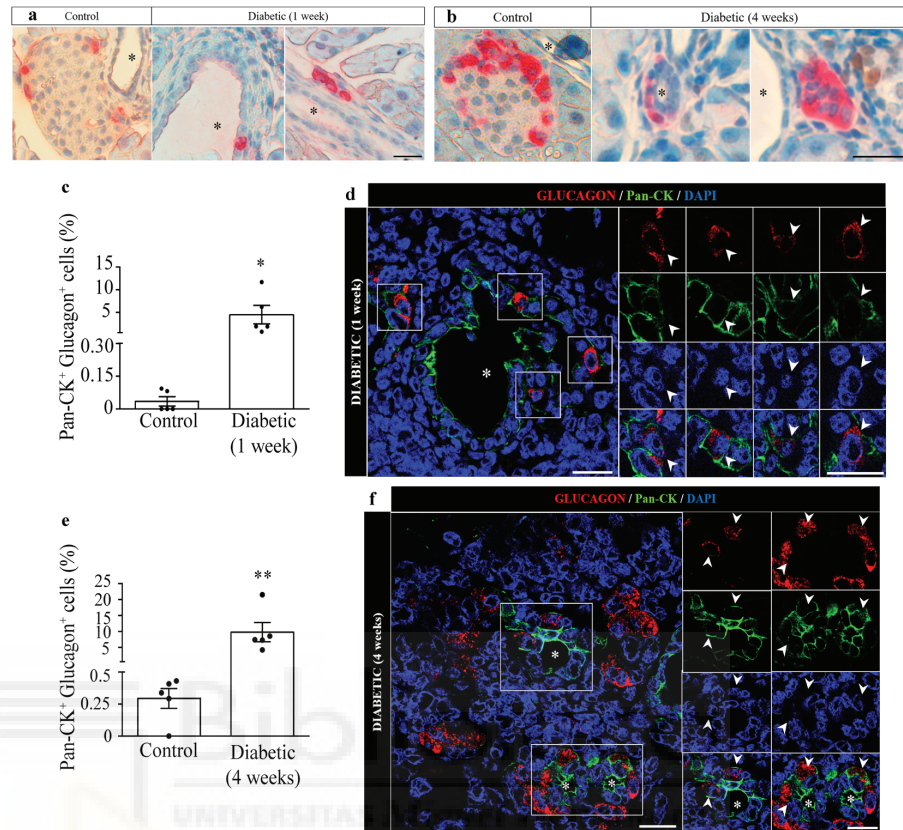
**Figure 4.** Pancreatic alpha-cell mass, alpha-cell size, proliferation and apoptosis in RIP-B7.1 mice four weeks after diabetes onset. (a) Pancreatic weight as percentage of body weight. (b) Alpha-cell area expressed as the percentage of the glucagon-positive area over the total pancreatic area. (c) Alpha-cell mass. (d) Alpha-cell size. (e) Alpha-cell number per pancreatic area. (f) Proliferation rate: percentage of glucagon and PCNA double-positive cells respect to glucagon-positive cells. (g) Apoptosis rate: percentage of glucagon and TUNEL double-positive cells respect to glucagon-positive cells. No TUNEL-positive alpha-cells were found in the pancreas from four-week diabetic mice. (h) Representative images from control and diabetic mice depicting proliferating alpha-cells. Left panels are enlargements of boxed areas (scale bar: 50  $\mu\text{m}$ ). Black arrows indicate PCNA (brown) and glucagon (pink) double-positive cells. (i) Representative images of TUNEL immunofluorescence from control and diabetic mice. Left panels are enlargements of boxed areas (scale bar: 20  $\mu\text{m}$ ). White arrows indicate TUNEL (green) and glucagon (red) double-positive cells in control mice, and non-alpha apoptotic cells in diabetic mice. Nuclei were stained with DAPI (blue). N = 5 mice per condition and group in each experiment. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test (a–e), Mann-Whitney test (f). Statistical significance is indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

**Bi-hormonal cells expressing both insulin and glucagon are increased in the pancreas of diabetic mice.** We next evaluated whether alpha-to-beta cell transdifferentiation could be involved in the regulation of the alpha-cell mass during EAD. For this purpose, we analysed the presence of islet cells expressing both insulin and glucagon. We found a significant increase in the percentage of bi-hormonal cells in both one-week and four-week diabetic mice compared with controls (Fig. 6), in which the presence of double-positive cells was negligible. To further confirm these findings, we evaluated the presence of cells positive for glucagon and PDX1, a transcription factor specifically expressed in postnatal immature and mature beta-cells<sup>33</sup>. The percentage of cells positive for glucagon and PDX1 was increased in diabetic animals at both stages (Fig. 7).

### Discussion

Research in T1D has focused mainly on the pancreatic beta-cell mass and its regeneration<sup>1</sup>. However, despite the involvement of the pancreatic alpha-cell in the aetiology of this disease and its complications<sup>2,3,9</sup>, little is known about this islet cell population in T1D. In the present study, we have analysed the alpha-cell mass in an EAD-inducible model, the RIP-B7.1 mouse. As mentioned earlier, the RIP-B7.1 mouse appears to possess most of the human attributes to study alpha-cell mass in T1D.



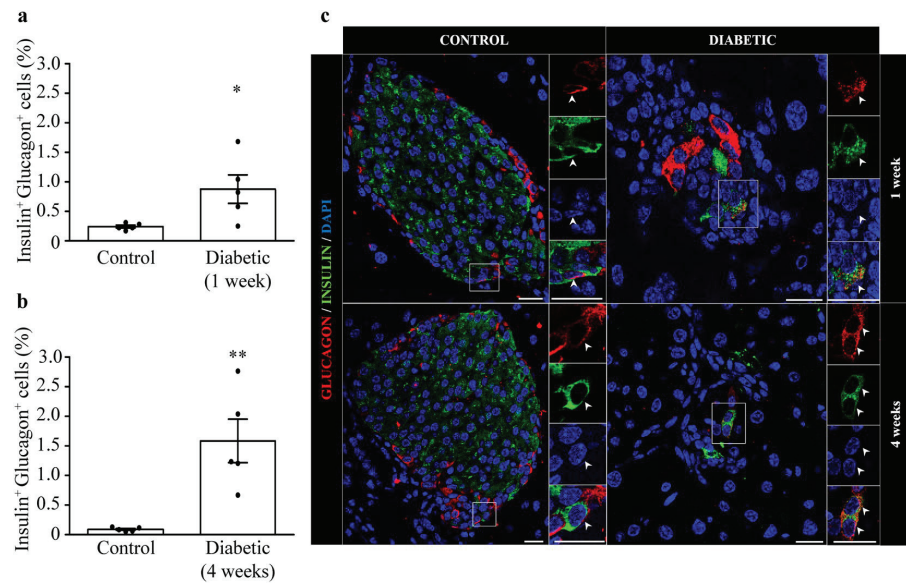


**Figure 5.** Quantification of pancreatic cells expressing both glucagon and the ductal epithelium marker pan-CK in one-week and four-week diabetic RIP-B7.1 mice. Representative images of glucagon-positive cells (pink) within or near the ductal epithelium in two different one-week (a) and four-weeks (b) diabetic mice and their respective controls. Scale bar: 50  $\mu$ m. (c) Percentage of cells positive for glucagon and the ductal marker pan-CK respect to total alpha-cells in the pancreas from one-week diabetic mice. (e) Percentage of cells positive for glucagon and the ductal marker pan-CK respect to total alpha-cells in the pancreas from four-week diabetic mice. (d,f) Representative images of double-positive cells expressing pan-CK (green) and glucagon (red) in one-week (d) and four-week (f) diabetic mice. Nuclei were stained with DAPI (blue). Right panels show enlargements of boxed areas. White arrows indicate double-positive cells. Pancreatic ducts are indicated (\*). N = 5 mice per group. Scale bar: 20  $\mu$ m. Control representative images are shown in Supplemental Fig. 4. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Mann-Whitney test. Statistical significance is indicated: \*\* $p < 0.01$ .

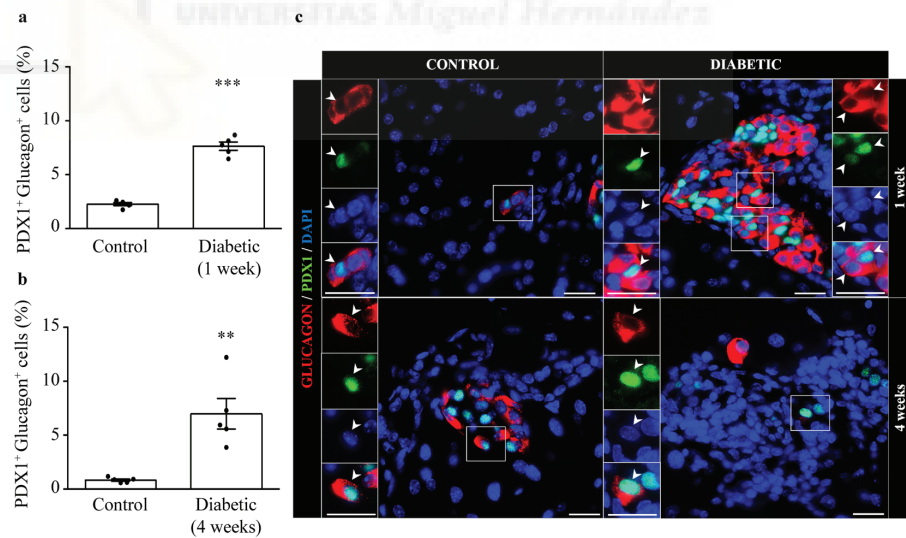
Human T1D is associated with hyperglucagonemia, which can exacerbate the hyperglycaemic state<sup>9</sup>. Unfortunately, this condition is not faithfully recapitulated in all mouse models. For instance, NOD mice, the most used EAD model, do not consistently exhibit hyperglucagonemia with diabetes evolution<sup>18</sup>, while this situation is present in pre-diabetic states<sup>7</sup>. In contrast, STZ-induced diabetic mice show a significant increment in plasma glucagon<sup>6</sup>. Herein, we demonstrate that RIP-B7.1 mice develop hyperglucagonemia during the course of EAD mimicking the human phenotype. Given that a hypoinsulinemic intra-islet environment can favour glucagon hypersecretion<sup>2,3,34</sup>, the high glucagon levels of diabetic RIP-B7.1 mice were most probably related with the low plasma and pancreatic insulin levels found in these animals.

Analysis of the alpha-cell mass in different T1D models has resulted in diverse outcomes. Plesner and colleagues reported an increase of the alpha-cell mass in the STZ single-dose model<sup>18</sup>. In contrast, the alpha-cell mass was unaltered with disease progression in either NOD mice<sup>18</sup> or in the STZ multiple low-dose model<sup>6,19</sup>. Given that beta-cell death in NOD mice and in the STZ multiple low-dose model results in islet inflammation<sup>20</sup>, while this process is absent in the single STZ dose model<sup>20</sup>, it is possible that pancreatic insulinitis may restrict alpha-cell expansion. Consistent with this premise, an inverse correlation between the insulinitis grade and the proportion of alpha-cells was observed in islets of four-week diabetic RIP-B7.1 mice. In this context, both alpha-cell mass and pancreatic glucagon content were found to be preserved in our one-week diabetic mice, as has been reported in T1D mouse models with islet infiltration<sup>6,18,19</sup> and recent-onset T1D patients<sup>12</sup>. In contrast, at four weeks after diabetes onset, both parameters were diminished. This decrease is consistent with studies conducted





**Figure 6.** Increase of bi-hormonal cells expressing both insulin and glucagon in the pancreas of one-week and four-week diabetic mice. Percentage of bi-hormonal cells positive for insulin and glucagon respect to glucagon-positive cells in control and diabetic mice one week (a) and four weeks (b) after diabetes onset. (c) Representative images showing double-positive cells for glucagon (red) and insulin (green) in control and diabetic mice. Right panels are enlargements of boxed areas with white arrows indicating double-positive cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 20  $\mu$ m. N = 5 mice per group. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Mann-Whitney test. Statistical significance is indicated: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .



**Figure 7.** Increase of cells expressing both PDX1 and glucagon in the pancreas of one-week and four-week diabetic mice. Percentage of cells positive for PDX1 and glucagon respect to total glucagon-positive cells in control and diabetic mice one week (a) and four weeks (b) after diabetes onset. (c) Representative images showing double-positive cells for PDX1 (green) and glucagon (red) in control and diabetic mice. Left panels are enlargements of boxed areas with white arrows indicating double-positive cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 20  $\mu$ m. N = 5 mice per group. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test (a), Mann-Whitney test (b). Statistical significance is indicated: \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

in patients primarily with long-term T1D<sup>13,14</sup>, suggesting that the alpha-cell pool is gradually depleted with disease progression. In any case, further studies are necessary to establish whether the inflammatory process as well as other factors such as the hyperglycaemic environment can modulate the pancreatic alpha-cell mass during T1D.

Interestingly, alpha-cell size, proliferation and neogenesis were increased at both stages in diabetic RIP-B7.1 mice, whereas no significant changes in alpha-cell apoptosis were observed, suggesting an active cellular renewal during the course of EAD. In agreement with our findings, increased human alpha-cell proliferation has been reported at the recent onset of T1D<sup>17</sup>. Conversely, reduced values have been obtained in young adults and children with T1D<sup>15</sup>. In the case of animal models, different results have been documented. While studies with mice treated with multiple STZ low-dose showed either an increased<sup>8</sup> or similar<sup>19</sup> alpha-cell proliferation rate, this parameter was found to be reduced in diabetic NOD mice<sup>18</sup>. A low alpha-cell apoptotic rate in the diabetic animals was not unexpected since rodent and human alpha-cells display a high apoptosis resistance in diabetic environments due to a specific set of proteins that allow their survival<sup>35,36</sup>. This indicates that apoptosis may not play a significant role in the regulation of alpha-cell mass during EAD. In any case, we cannot discard that previous apoptotic events might contribute to the decreased alpha-cell mass observed in four-week diabetic animals. Consistent with findings in NOD mice<sup>30</sup>, we detected a group of glucagon-positive cells expressing a ductal epithelium marker, which suggests the presence of neogenic processes from the ducts in T1D. Although ductal neogenesis probably does not contribute to the endocrine cell mass in adult mice under physiological situations<sup>31</sup>, this process can represent a potential source of new beta-cells under experimental and pathological conditions<sup>32,37</sup>. Proliferation and neogenesis try to compensate for beta-cell loss during T1D progression in an attempt to regenerate the beta-cell population<sup>37</sup>. Our results suggest that both processes perform a similar role to maintain the alpha-cell population in RIP-B7.1 diabetic mice.

The lack of apoptosis combined with stimulated cell proliferation and neogenesis would argue in favour of increased alpha-cell mass. Yet we observed a decrease in alpha-cell mass during the course of diabetes, suggesting that other cellular processes were contributing to the overall alpha-cell population. In this context, we found a higher percentage of bi-hormonal cells expressing insulin and glucagon in both one- and four-week diabetic RIP-B7.1 mice, substantiating previous reports showing that alpha-to-beta cell transdifferentiation could be an important spontaneous route of beta-cell regeneration in several EAD mouse models<sup>22,24,28,38,39</sup> and in human T1D subjects<sup>16,40</sup>. Several works have shown that alpha-to-beta cell transdifferentiation takes place following a bi-hormonal intermediary expressing both insulin and glucagon<sup>16,22</sup>. In contrast, beta-cells do not seem to spontaneously transdifferentiate to glucagon-expressing cells after near total alpha-cell loss<sup>41</sup>, indicating that alpha-to-beta cell reprogramming may be a prevalent process in diabetes. We also detected a higher percentage of alpha-cells labelled for PDX1, which is specifically expressed in immature and mature postnatal beta-cells<sup>33</sup>. The presence of alpha-cells expressing this transcription factor has also been reported in beta-cell loss models<sup>16,22,38</sup> and in T1D patients<sup>23,42</sup>. Additionally, forced expression of PDX1 along with MAFA induces alpha-to-beta transdifferentiation in NOD mice and STZ-treated human islets<sup>43,44</sup>. Thus, the occurrence of glucagon-positive cells expressing insulin and/or PDX1 seems to be more related with a process of alpha-to-beta reprogramming<sup>16,22,38,39,45</sup> rather than alpha-cell dedifferentiation to an early endocrine progenitor<sup>33</sup>. Additionally, no bi-hormonal cells have been identified in mouse models of beta-cell dedifferentiation<sup>46</sup>. Taken together, our results suggest that alpha-to-beta cell transdifferentiation may contribute long-term to the decrease of the alpha-cell mass in diabetic RIP-B7.1 mice. These findings also indicate that the increased alpha-cell turnover observed in EAD could be associated with the maintenance of an alpha-cell pool to replenish beta-cells, as previously reported for the inactivation of *Arx* in alpha-cells, which induces both alpha-to-beta transdifferentiation and, subsequently, alpha-cell ductal neogenesis<sup>47</sup>. Alternatively, the increased regeneration observed in our model might be a compensatory response to the loss of functional alpha-cells in order to maintain the alpha-cell population and its related functions. Newly formed beta-cells are more vulnerable to cytokine-induced cell death<sup>48</sup>. Thus, this could constrain the alpha-cell capacity to repopulate beta-cells at the expense of its own mass when facing increasing cytokine levels.

While the presence of glucagon-positive cells expressing insulin and/or PDX1 has been documented in several EAD models<sup>16,22,24,38,39</sup> and in T1D donors<sup>16,40,42</sup>, other studies have not found these bi-hormonal cells in T1D patients<sup>49</sup>. Thus, it is possible that the occurrence of transdifferentiation events may depend on some variables such as subject age, diabetes duration, glycaemic and immune conditions, as well as stress or injury level, as has been suggested from diabetes mouse models<sup>22,24,50</sup> and human T1D studies<sup>23,49</sup>. It has been also shown that the frequency of bi-hormonal cells could change when considering the time after beta-cell loss<sup>50</sup>. In this regard, the proportion of insulin/glucagon double-positive cells has not been found to be increased in RIP-B7.1 mice when analysed at eight weeks after immunization<sup>28</sup>. However, it is important to mention that the conditions of EAD and analysis were different from those used in our present study. The former report was focused on the immune process and used mice at four and eight weeks after immunization, which implied about 50% and 80% of diabetes incidence, respectively<sup>28</sup>. In contrast, all mice employed in the present study were diabetic, taking into account the moment of diabetes onset: one week and four weeks after the development of hyperglycaemias. In our case, the one-week diabetic group involved a period after immunization that ranged from 3 to ~7 weeks, while the four-week group implicated a period of about 7 to 15 weeks after immunization. Thus, it is difficult to compare both studies given that animals were at different stages of immunization and diabetes, and it may lead to different outcomes, as mentioned above<sup>22–24,49,50</sup>. The findings of the current research, in which all animals were diabetic, are consistent with different studies in T1D mouse models and T1D human pancreata showing an increase in bi-hormonal cells<sup>22–24,40</sup>. Four weeks after immunization, alpha-cell mass was also found to be reduced in RIP-B7.1 mice<sup>28</sup>. Given that T-cell infiltration in islets from RIP-B7.1 mice is already detected two weeks after immunization<sup>25</sup>, it is possible that the autoimmune attack could modulate alpha-cell mass before diabetes onset<sup>21</sup>. Therefore, experimental conditions, diabetes stages and immunization times, among other factors, appear to be important to analyse alpha-cell mass during EAD, as suggested in different studies<sup>22–24,49,50</sup>. Overall, all these findings indicate that the alpha-cell mass and the processes involved in its regulation are dynamic and present high plasticity during the course of EAD.

In summary, we report here that the alpha-cell population is preserved at the early-onset of autoimmune diabetes, in contrast to the known situation of the beta-cells<sup>1</sup>. Pancreatic alpha-cell mass, however, undergoes a decrease at advanced diabetes. In both stages, several processes involved in the control of islet cell mass such as cell size, proliferation and ductal neogenesis were up-regulated, while apoptosis was almost negligible. Additionally, an increased rate of bi-hormonal cells and glucagon/PDX1-positive cells was detected, suggesting a process of alpha-to-beta transdifferentiation. Thus, our findings indicate that, in autoimmune diabetes, alpha-cells are facing an intense regenerative state in an effort to maintain alpha-cell mass and/or to sustain a cell pool directed to regenerate beta-cells. These results also support that pancreatic alpha-cells present a significant capability to adapt to EAD, and that this plasticity may be potentially used as an approach to beta-cell regeneration in T1D.

## Methods

**Mouse model and EAD induction.** The murine model of experimental autoimmune diabetes RIP-B7.1 (H-2<sup>b</sup>) C57BL/6J express the immune system stimulatory molecule B7.1 (CD80) under the rat insulin promoter (RIP) in pancreatic beta-cells, increasing the beta-cell susceptibility to autoimmune destruction<sup>25,27</sup>. EAD was induced by DNA immunization as previously described<sup>25</sup>. For experimental studies, male and female heterozygous F1 animals (C57BL/6J × RIP-B7.1) were used at  $12.5 \pm 0.42$  weeks for the early-onset study and at  $15.8 \pm 0.46$  weeks for the advanced stage study. DNA immunization was performed as previously described<sup>27</sup>. Briefly, 50 µg of plasmid DNA (dissolved in 50 µl PBS) expressing murine preproinsulin II (Plasmid Factory, Germany) was injected into each tibialis anterior muscle. Age and sex-matched heterozygous RIP-B7.1 control mice were injected with only PBS. Blood samples were collected from tail vein and glycemia was monitored every two days using an automatic glucometer (Accu-Chek Compact plus, Roche). Mice were considered diabetic when two consecutive blood glucose measurements in non-fasting state exceeded 250 mg/dl<sup>27</sup>. To study the alterations in the early-onset of EAD, experiments were performed one week after diabetes initiation in mice originally housed in CABIMER animal facilities, which were sent to the Miguel Hernández University immediately after their immunization. For the study of mice with established diabetes, experiments were carried out four weeks after diabetes onset in mice housed in the Miguel Hernández University animal facilities. In the present study, about 85% of the total immunized animals presented hyperglycaemia and developed diabetes after the vaccination with preproinsulin. Only those immunized mice that developed hyperglycaemia were studied in the corresponding diabetic group. All studies were approved by the Animal Ethics Committee of the Miguel Hernández University according to national regulations and approved guidelines.

**Plasma and total pancreatic hormone measurements.** Plasma glucose, insulin, and glucagon levels were measured in non-fasting state<sup>51</sup>. For hormonal measurements, blood was collected by decapitation after CO<sub>2</sub> anaesthesia with a K2 EDTA coated Microvette tube (Sarstedt) and in the presence of 500 KIU/ml aprotinin (Sigma-Aldrich). Then, blood was centrifuged at 200 g for 20 minutes at 4 °C and plasma was collected and stored at -80 °C. To measure pancreatic glucagon and insulin content, pancreata were dissected and placed in a tube containing 5 ml of acid-ethanol buffer (75% EtOH, 1.5% HCl). After overnight incubation at -20 °C, samples were homogenised and reincubated overnight again at -20 °C. Afterwards, extracts were centrifuged at 400 g for 15 minutes at 4 °C and supernatants were neutralized with 1 M Tris (pH 7.4) before ELISA measurements. Results were normalized by the total protein pancreatic content measured by the Bradford assay. Glucagon and insulin levels were assessed by ELISA (Mercodia, #10-1271-01; Crystal Chem, #90080; respectively) following commercial instructions.

**Immunohistochemistry and proliferation analysis.** Pancreata were dissected, cleared from fat and lymph nodes and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 22 hours at 4 °C. Then, pancreata were weighted, embedded in paraffin and sectioned. For immunohistochemical studies, two to three pancreatic sections (5 µm) were cut 200 µm apart<sup>51</sup>. The whole pancreatic section was examined. To study alpha-cell mass and proliferation, the kit EnVision G/2 Doublestain System (DAB+/Permanent Red) was used following commercial instructions (DAKO K5361, Agilent Technologies). Antigen retrieval was performed by heating the samples with a microwave in citrate buffer (12 mM, pH 6.0). The slides were blocked by incubation for 2 hours in 3% BSA in PBS. For alpha-cell detection, rabbit anti-glucagon antibody (1:100, PS087, Monosan) was used. Proliferation was analysed using the proliferating cell nuclear antigen (mouse anti-PCNA, 1:4000, #2586, Cell Signalling) labelling technique<sup>51</sup>. Both antibodies were incubated overnight at 4 °C. Samples were counterstained with haematoxylin-eosin for nuclei counting and mounted with Faramount aqueous mounting medium (DAKO S3025, Agilent Technologies). Stained slides were imaged at 4x for quantification of total pancreatic area, and at 20x for pancreatic islets and glucagon-stained area. A Kappa ACC1 camera attached to a Nikon Eclipse TE200 Microscope was used for the early-onset study, while an Olympus IX71S8F-2 Microscope with an Image Development Systems camera was used for the long-term study. Total pancreatic and glucagon-positive area were measured in each slide using the Metamorph Analysis Software (Nashville, TN, USA) according to previous reports<sup>51,52</sup>. Pancreatic alpha-cell area was calculated by measuring the total glucagon-stained area normalized by the total pancreatic area. Alpha-cell size was evaluated by dividing the alpha-cell area by the total number of alpha-cell nuclei. Alpha-cell mass was then calculated multiplying the alpha-cell area by the pancreas weight. Proliferation rate was expressed as percentage of alpha-cells with PCNA-positive nuclei respect to the total alpha-cells.

**Immunofluorescence analysis.** Pancreata were collected, fixed and processed as described above. Alpha-cell apoptotic rate was analyzed by TUNEL as previously described<sup>51,52</sup>, using the manufacturer's protocol for difficult tissue (*In Situ* Cell Death Detection Kit, Roche). After dehydration, antigen retrieval was performed by heating the samples with a microwave in citrate buffer (12 mM, pH 6.0) for 20 minutes followed by a treatment during 20 minutes with Tris-HCl buffer (0.1 M, pH 7.5, 3% BSA, 20% FBS). Then, slides were incubated with TUNEL reaction mix for 1 hour at 37 °C. Afterwards, slides were blocked in 3% BSA for 2 hours before incubation

with a rabbit anti-glucagon antibody (1:100, PS087, Monosan) at 4 °C overnight<sup>51</sup>. To assess alpha-cell neogenesis from pancreatic duct epithelium, antigen retrieval was also performed by heating the samples with a microwave in citrate buffer (12 mM, pH 6.0) followed by incubation with trypsin (0.5 mg/ml) at 37 °C for 30 minutes. Then, samples were blocked by incubation in 3% BSA for 2 hours. Slides were incubated overnight at 4 °C with rabbit anti-glucagon (1:100, PS087, Monosan) and mouse anti-pan-Cytokeratin (1:300, pan-CK, sc-8018, Santa Cruz Biotechnology) antibodies. The presence of bi-hormonal cells expressing both insulin and glucagon was studied by the incubating slides with antibodies against insulin (1:100, rabbit anti-insulin, #C1212, Santa Cruz Biotechnology) and glucagon (1:100, mouse anti-glucagon, C2654, Sigma), after antigen retrieval with citrate buffer (12 mM, pH 6.0) and blocking for 2 hours with 3% BSA. Likewise, PDX1 expression in glucagon-positive cells was assessed using guinea pig anti-PDX1 antibodies (1:200, ab47308, abcam).

For fluorescence detection, all samples were incubated with the corresponding secondary antibodies, Alexa Fluor 546 or 488 (1:500, Life Technologies), for 2 hours at room temperature. Total nuclei were stained with Hoechst 33342 (1:1000, Invitrogen) and sections were mounted using ProLong Gold Antifade Reagent (P36930, Invitrogen). Images were acquired using a Zeiss Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss) equipped with an ApoTome system, which allowed obtaining optical sections (0.7 µm) with an objective EC Plan-NEOFLUAR 40x. Images were analysed using Metamorph Analysis Software (Nashville, TN, USA). Individual glucagon-positive cells were assessed manually for double labelling following two criteria: single nucleus surrounded by a glucagon-positive cytoplasm and matching staining of nucleus or cytoplasm with the antibody of interest. Negative controls were obtained using samples in which the complete protocol was performed except for the incubation with the primary antibodies. A positive control was also used for the TUNEL analysis, as indicated in the manufacturer's instructions.

**Insulinitis and glucagon score.** As previously reported<sup>18,39</sup>, insulinitis and glucagon scoring were performed according to the percentage of infiltrated/glucagon islet area: grade 0, 0%; grade 1, <10%; 10% < grade 2 >55%; 55% < grade 3 >75%; grade 4 >75%. Note that insulinitis grade 0 involves pre-inflammation islets as well as post-inflammation islets where infiltration has dispersed. Insulinitis and glucagon were scored in the same pancreatic sections employed for alpha-cell mass and proliferation measurements, and thus, PCNA-positive cells (labelled in brown) are also observed in the Supplementary Fig. 2. As in similar studies<sup>18,39</sup>, immune cells in infiltrated islets were easily visualized with the haematoxylin staining by their characteristic dense nuclei and small size.

**Data representation and analysis.** Statistical analysis was performed with GraphPad Software v5. After testing for normality, we performed Student's t-test or the nonparametric test Mann-Whitney when variables were not normally distributed. Two-way ANOVA with Bonferroni correction was employed when required. Data are presented as mean ± SEM and statistical significance was set at  $p < 0.05$  for all analyses.

#### Data Availability

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### References

- Rowe, P. A., Campbell-Thompson, M. L., Schatz, D. A. & Atkinson, M. A. The pancreas in human type 1 diabetes. *Semin Immunopathol* **33**, 29–43, <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0208-x> (2011).
- Gaisano, H. Y., MacDonald, P. E. & Vranic, M. Glucagon secretion and signaling in the development of diabetes. *Front Physiol* **3**, <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00349> (2012).
- Marroqui, L. *et al.* Nutrient regulation of glucagon secretion: involvement in metabolism and diabetes. *Nutrition research reviews* **27**, 48–62, <https://doi.org/10.1017/s0954422414000031> (2014).
- Farhy, L. S. *et al.* Association of Basal hyperglucagonemia with impaired glucagon counterregulation in type 1 diabetes. *Front Physiol* **3**, 40, <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00040> (2012).
- Brown, R. J., Sinait, N. & Rother, K. I. Too much glucagon, too little insulin: time course of pancreatic islet dysfunction in new-onset type 1 diabetes. *Diabetes care* **31**, 1403–1404, <https://doi.org/10.2337/dc08-0575> (2008).
- Huang, Y. C. *et al.* *In situ* electrophysiological examination of pancreatic alpha cells in the streptozotocin-induced diabetes model, revealing the cellular basis of glucagon hypersecretion. *Diabetes* **62**, 519–530, [db11-0786](https://doi.org/10.2337/13117) (2013).
- Homo-Delarche, F. Is pancreas development abnormal in the non-obese diabetic mouse, a spontaneous model of type I diabetes? *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas* **34**, 437–447 (2001).
- Takeda, Y. *et al.* Reduction of both beta cell death and alpha cell proliferation by dipeptidyl peptidase-4 inhibition in a streptozotocin-induced model of diabetes in mice. *Diabetologia* **55**, 404–412, <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2365-4> (2012).
- Cryer, P. E. M. Glucagon in the pathogenesis of hypoglycemia and hyperglycemia in diabetes. *Endocrinology* **153**, 1039–1048, <https://doi.org/10.1210/en.2011-1499> (2012).
- Habener, J. F. & Stanojevic, V. Alpha-cell role in beta-cell generation and regeneration. *Islets* **4**, 188–198, <https://doi.org/10.4161/isl.20500> (2012).
- Lee, Y., Wang, M. Y., Du, X. Q., Charron, M. J. & Unger, R. H. Glucagon receptor knockout prevents insulin-deficient type 1 diabetes in mice. *Diabetes* **60**, 391–397, <https://doi.org/10.2337/db10-0426> (2011).
- Sayama, K. *et al.* Pancreatic beta and alpha cells are both decreased in patients with fulminant type 1 diabetes: a morphometrical assessment. *Diabetologia* **48**, 1560–1564, <https://doi.org/10.1007/s00125-005-1829-9> (2005).
- Bonnet-Serrano, F., Diedisheim, M., Mallone, R. & Larger, E. Decreased alpha-cell mass and early structural alterations of the exocrine pancreas in patients with type 1 diabetes: An analysis based on the nPOD repository. *PLoS one* **13**, e0191528, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191528> (2018).
- Waguri, M. *et al.* Histopathologic study of the pancreas shows a characteristic lymphocytic infiltration in Japanese patients with IDDM. *Endocrine journal* **44**, 23–33 (1997).
- Lam, C. J., Cox, A. R., Jacobson, D. R., Rankin, M. M. & Kushner, J. A. Highly Proliferative alpha-Cell-Related Islet Endocrine Cells in Human Pancreata. *Diabetes* **67**, 674–686, <https://doi.org/10.2337/db17-1114> (2018).
- Piran, R. *et al.* Pharmacological induction of pancreatic islet cell transdifferentiation: relevance to type I diabetes. *Cell death & disease* **5**, e1357, <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.311> (2014).
- Willcox, A., Richardson, S. J., Bone, A. J., Foulis, A. K. & Morgan, N. G. Evidence of increased islet cell proliferation in patients with recent-onset type 1 diabetes. *Diabetologia* **53**, 2020–2028, <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1817-6> (2010).



18. Plesner, A. Islet remodeling in female mice with spontaneous autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *PLoS one* **9**, e102843, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102843> (2014).
19. Meier, J. J., Ueberberg, S., Korbas, S. & Schneider, S. Diminished glucagon suppression after beta-cell reduction is due to impaired alpha-cell function rather than an expansion of alpha-cell mass. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **300**, E717–723, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00315.2010> (2011).
20. King, A. J. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* **166**, 877–894, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x> (2012).
21. Yosten, G. L. C. Alpha cell dysfunction in type 1 diabetes. *Peptides* **100**, 54–60, <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2017.12.001> (2018).
22. Thorel, F. *et al.* Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* **464**, 1149–1154 (2010).
23. Chakravarthy, H. *et al.* Converting Adult Pancreatic Islet  $\alpha$  Cells into  $\beta$  Cells by Targeting Both Dnmt1 and Arx. *Cell Metab* **25**, 622–634, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.01.009> (2017).
24. Cigliola, V. *et al.* Pancreatic islet-autonomous insulin and smoothened-mediated signalling modulate identity changes of glucagon(+) alpha-cells. *Nature cell biology* **20**, 1267–1277, <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0216-y> (2018).
25. Karges, W. *et al.* The diabetogenic, insulin-specific CD8 T cell response primed in the experimental autoimmune diabetes model in RIP-B7.1 mice. *European journal of immunology* **37**, 2097–2103, <https://doi.org/10.1002/eji.200737222> (2007).
26. Reddy, S., Chai, R. C., Rodrigues, J. A., Hsu, T. H. & Robinson, E. Presence of residual beta cells and co-existing islet autoimmunity in the NOD mouse during longstanding diabetes: a combined histochemical and immunohistochemical study. *Journal of molecular histology* **39**, 25–36, <https://doi.org/10.1007/s10735-007-9122-5> (2008).
27. Rajasalu, T. *et al.* Experimental autoimmune diabetes: a new tool to study mechanisms and consequences of insulin-specific autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* **1037**, 208–215 (2004).
28. Cobo-Vuilleumier, N. *et al.* LRH-1 agonism favours an immune-islet dialogue which protects against diabetes mellitus. *Nat Commun* **9**, 1488, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03943-0> (2018).
29. Mellado-Gil, J. M. *et al.* PAX4 preserves endoplasmic reticulum integrity preventing beta cell degeneration in a mouse model of type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* **59**, 755–765, <https://doi.org/10.1007/s00125-016-3864-0> (2016).
30. O'Reilly, L. A. *et al.* alpha-Cell neogenesis in an animal model of IDDM. *Diabetes* **46**, 599–606 (1997).
31. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. & Melton, D. A. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* **429**, 41–46, <https://doi.org/10.1038/nature02520> (2004).
32. Bonner-Weir, S. *et al.* Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes* **59**, 2340–2348, <https://doi.org/10.2337/db10-0084> (2010).
33. Van der Meulen, T. & Huising, M. O. The role of transcription factors in the transdifferentiation of pancreatic islet cells. *J Mol Endocrinol* **54**, R103–117, <https://doi.org/10.1530/jme-14-0290> (2015).
34. Xu, E. *et al.* Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab* **3**, 47–58, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.11.015> (2006).
35. Marroqui, L. *et al.* Differential cell autonomous responses determine the outcome of coxsackievirus infections in murine pancreatic alpha and beta cells. *eLife* **4**, e06990, <https://doi.org/10.7554/eLife.06990> (2015).
36. Marroqui, L. *et al.* Pancreatic alpha Cells are Resistant to Metabolic Stress-induced Apoptosis in Type 2 Diabetes. *EBioMedicine* **2**, 378–385, <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2015.03.012> (2015).
37. Mezza, T. & Kulkarni, R. N. The regulation of pre- and post-maturational plasticity of mammalian islet cell mass. *Diabetologia* **57**, 1291–1303, <https://doi.org/10.1007/s00125-014-3251-7> (2014).
38. Chung, C. H., Hao, E., Piran, R., Keinan, E. & Levine, F. Pancreatic beta-cell neogenesis by direct conversion from mature alpha-cells. *Stem cells* **28**, 1630–1638, <https://doi.org/10.1002/stem.482> (2010).
39. Bi, X. *et al.* omega-3 polyunsaturated fatty acids ameliorate type 1 diabetes and autoimmunity. *The Journal of clinical investigation* **127**, 1757–1771, <https://doi.org/10.1172/jci87388> (2017).
40. Lam, C. J., Chatterjee, A., Shen, E., Cox, A. R. & Kushner, J. A. Low Level Insulin Content Within Abundant Non-Beta Islet Endocrine Cells in Long-Standing Type 1 Diabetes. *Diabetes* **67**, 674–686, <https://doi.org/10.2337/db18-0305> (2018).
41. Thorel, F. *et al.* Normal glucagon signaling and beta-cell function after near-total alpha-cell ablation in adult mice. *Diabetes* **60**, 2872–2882, <https://doi.org/10.2337/db11-0876> (2011).
42. Peter, S. *et al.* Characterization of the endocrine pancreas in Type 1 Diabetes: islet size is maintained but islet number is markedly reduced. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/480509> (2018).
43. Xiao, X. *et al.* Endogenous Reprogramming of Alpha Cells into Beta Cells, Induced by Viral Gene Therapy, Reverses Autoimmune Diabetes. *Cell stem cell* **22**, 78–90.e74, <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.11.020> (2018).
44. Matsuoka, T. A. *et al.* Maf Enables Pdx1 to Effectively Convert Pancreatic Islet Progenitors and Committed Islet alpha-Cells Into beta-Cells *In Vivo*. *Diabetes* **66**, 1293–1300, <https://doi.org/10.2337/db16-0887> (2017).
45. Bramswig, N. C. *et al.* Epigenomic plasticity enables human pancreatic alpha to beta cell reprogramming. *The Journal of clinical investigation* **123**, 1275–1284, <https://doi.org/10.1172/jci66514> (2013).
46. Talchai, C., Xuan, S., Lin, H. V., Sussel, L. & Accili, D. Pancreatic beta cell dedifferentiation as a mechanism of diabetic beta cell failure. *Cell* **150**, 1223–1234, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.029> (2012).
47. Courtney, M. *et al.* The inactivation of Arx in pancreatic  $\alpha$ -cells triggers their neogenesis and conversion into functional  $\beta$ -like cells. *PLoS Genet* **9**, e1003934, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003934> (2013).
48. Meier, J. J., Ritzel, R. A., Maedler, K., Gurlo, T. & Butler, P. C. Increased vulnerability of newly forming beta cells to cytokine-induced cell death. *Diabetologia* **49**, 83–89, <https://doi.org/10.1007/s00125-005-0069-3> (2006).
49. Brissova, M. *et al.* alpha Cell Function and Gene Expression Are Compromised in Type 1 Diabetes. *Cell reports* **22**, 2667–2676, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.032> (2018).
50. Chera, S. *et al.* Diabetes recovery by age-dependent conversion of pancreatic delta-cells into insulin producers. *Nature* **514**, 503–507, <https://doi.org/10.1038/nature13633> (2014).
51. Merino, B. *et al.* Pancreatic alpha-cells from female mice undergo morphofunctional changes during compensatory adaptations of the endocrine pancreas to diet-induced obesity. *Sci Rep* **5**, 11622 (2015).
52. Montanya, E. & Tellez, N. Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **560**, 137–158, [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-448-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-448-3_11) (2009).

## Acknowledgements

We thank M.S. Ramon and M.L. Navarro for their expert technical assistance. This research was supported by grants from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, Agencia Estatal de Investigación and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (BFU2013-42789; BFU2017-86579-R; BFU2016-77125-R; BFU2017-83588-P), Generalitat Valenciana (PROMETEOII/2015/016) and the Juvenile Diabetes Research Foundation (17-2013-372 to B.R.G.). L.M. holds a Juan de la Cierva fellowship from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (IJCI-2015-24482). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III.

### Author Contributions

E.B.T. and I.Q. designed the experiments; E.B.T. performed and analysed the experiments; E.B.T. N.C.V., P.A.M., R.D.S., L.M., A.N., B.R.G. and I.Q. interpreted the results; E.B.T., R.D.S., L.M. and I.Q. wrote the manuscript. All authors contributed to the discussion and reviewed and edited the manuscript.

### Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45853-1>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note:** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019



**Pancreatic alpha-cell mass in the early-onset and advanced stage of a mouse model  
of experimental autoimmune diabetes.**

Eva Bru-Tari<sup>1</sup>, Nadia Cobo-Vuilleumier<sup>2</sup>, Paloma Alonso-Magdalena<sup>1</sup>, Reinaldo S. Dos Santos<sup>1</sup>, Laura Marroqui<sup>1</sup>, Angel Nadal<sup>1</sup>, Benoit R. Gauthier<sup>2</sup>, Ivan Quesada<sup>1\*</sup>.

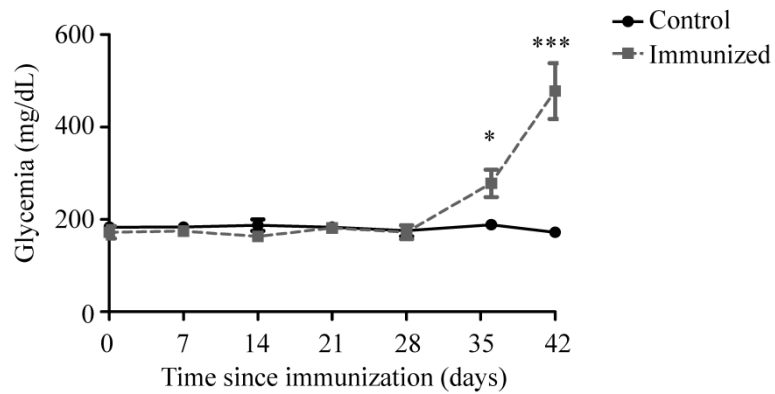
<sup>1</sup>Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), IBMC and Biomedical Research Center in Diabetes and Associated Metabolic Disorders (CIBERDEM), Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain.

<sup>2</sup>Department of Cell Regeneration and Advanced Therapies, Andalusian Center for Molecular Biology and Regenerative Medicine-CABIMER, Junta de Andalucía-University of Pablo de Olavide-University of Seville-CSIC, Seville, Spain.

\*Corresponding author:

I. Quesada. Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández de Elche, Avenida de la Universidad s/n, 03202 Elche, Spain. Email: [ivanq@umh.es](mailto:ivanq@umh.es)

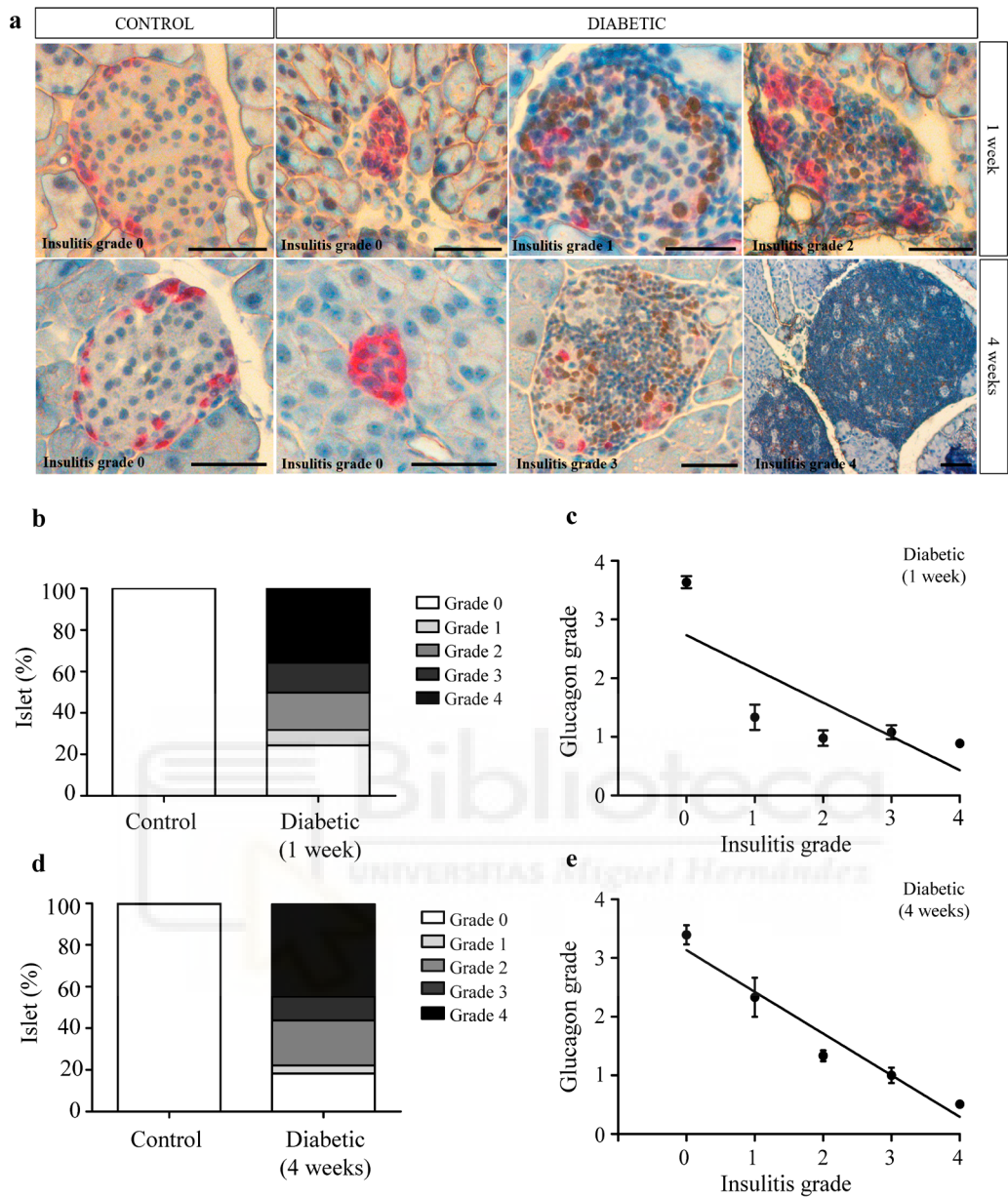
## SUPPLEMENTAL FIGURE 1



**Supplemental figure 1. Plasma glucose changes in RIP-B7.1 mice after immunization.** Time course of non-fasting glycemic values of a group of animals that developed diabetes at the same temporal range after preproinsulin DNA vaccine administration at day 0 (n=5 mice per condition). Data presented as mean  $\pm$  SEM. Two-way ANOVA. Statistical significance is indicated: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



**SUPPLEMENTAL FIGURE 2**



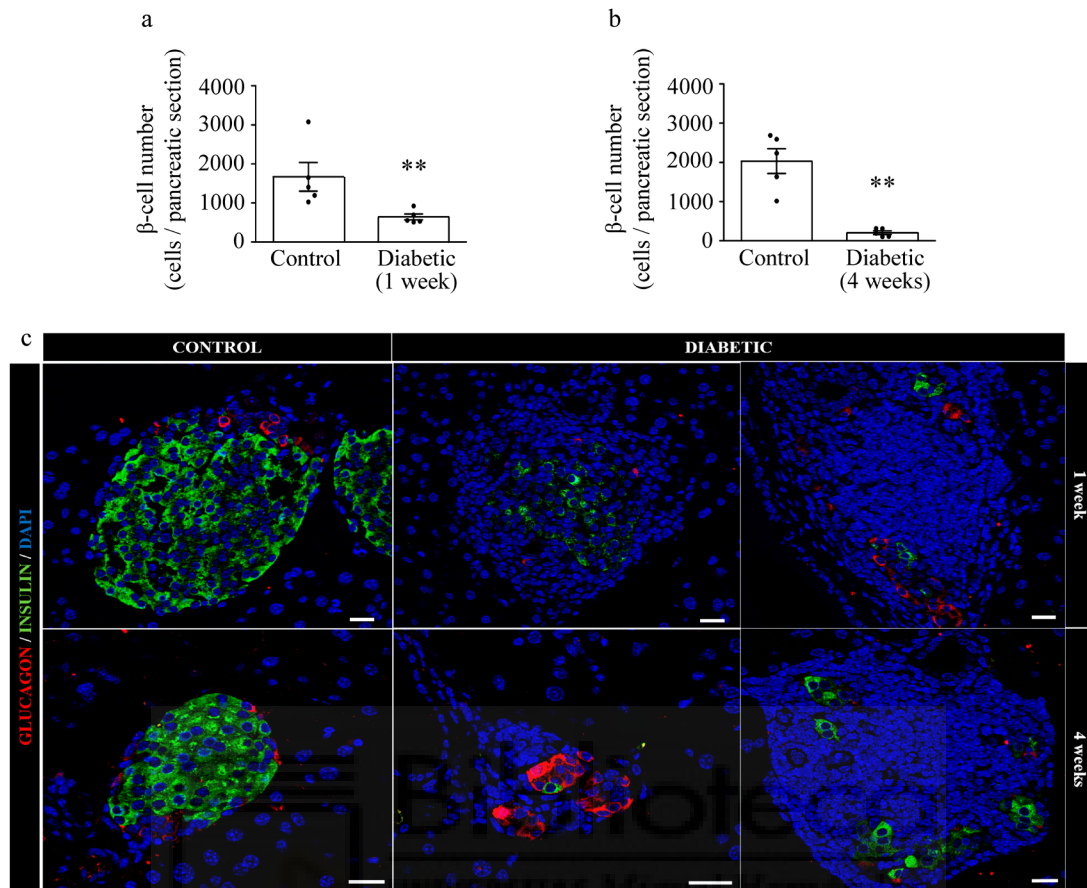
**Supplemental figure 2. Insulinitis and glucagon grades in pancreatic islets from diabetic mice and controls.** (a) Representative images of pancreatic islets from controls and one-week or four-week diabetic animals are shown. Images illustrate different degrees of insulinitis. Glucagon staining is labeled in pink, while nuclei were counterstained with hematoxylin-eosin. Scale bar: 50  $\mu$ m. (b) Insulinitis scoring of islets from one-week diabetic mice and controls represented as percentage of total islet number (n=288 islets from 5 control mice; n=255 islets from 5 diabetic mice). (c) Trend

to negative correlation between the islet percentage stained for glucagon (glucagon grade) and the insulinitis grade in one-week diabetic mice (Pearson  $r = -0.7839$ ,  $p=0.11$ ).

**(d)** Insulinitis scoring of islets from four-week diabetic mice and controls (n=352 islets from 5 control mice; n=234 islets from 5 diabetic mice). **(e)** Negative correlation between the islet percentage stained for glucagon (glucagon grade) and the insulinitis grade in four-week diabetic mice (Pearson  $r = -0.9745$ ,  $p<0.01$ ).

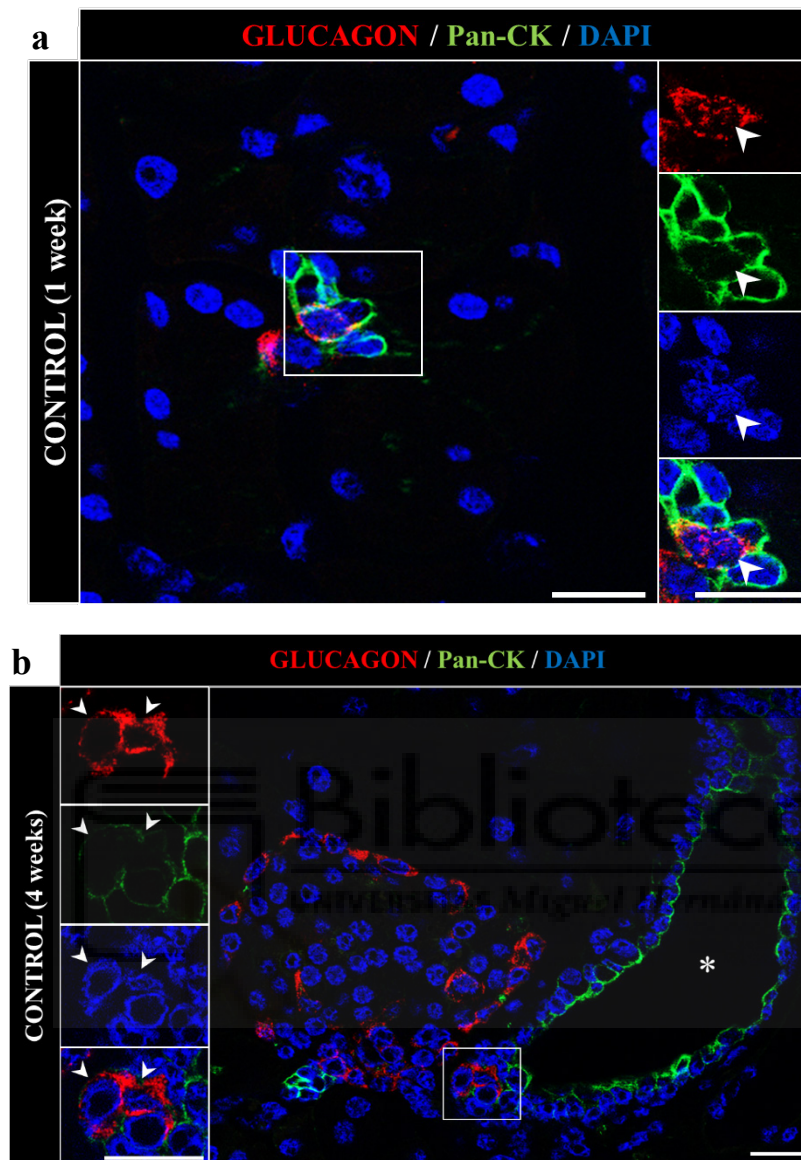


### SUPPLEMENTAL FIGURE 3



**Supplemental figure 3. Beta-cell number in the pancreas from control and diabetic mice.** Beta-cell number per pancreatic section in one-week (a) and four-weeks (b) diabetic mice. All insulin-positive cells from two pancreatic sections were counted for each mouse (n=5 mice per group). Each pancreatic section contained the whole tissue area. (c) Representative images of pancreatic islets from two different diabetic mice in both EAD stages, and their corresponding controls. Insulin is labelled in green, glucagon in red and total nuclei in blue. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Unpaired t-test. Statistical significance is indicated: \*\*,  $p < 0.01$ .

SUPPLEMENTAL FIGURE 4



**Supplemental figure 4. Representative images of control mice from figure 5.** Representative images of double-positive cells expressing pan-CK (green) and glucagon (red) in the pancreas of control mice. **(a)** representative control image of the one-week diabetic group. **(b)** representative control image of the four-weeks diabetic group. Nuclei were stained with DAPI (blue). Right and left panels show enlargements of boxed areas. White arrows indicate double-positive cells. Pancreatic ducts are indicated (\*). Scale bar: 20  $\mu$ m



## *Agradecimientos*

El final de este periodo no solo abarca la presente tesis doctoral, si no una larga etapa que comenzó en los inicios de mi formación académica en la Universidad Miguel Hernández. Durante estos años he conocido y trabajado con gente excepcional. He tenido la gran suerte de poder formar parte de un equipo extraordinario que me abrió las puertas de su laboratorio cuando aún no sabía coger una pipeta y por ello estoy enormemente agradecida.

En primer lugar, me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Ivan Quesada, por su gran apoyo durante estos años. Gracias por intentar sacar siempre lo mejor de mí y por toda la confianza que me has dado para sacar a delante este proyecto. Ha sido todo un privilegio trabajar contigo.

Gracias, Dr. Ángel Nadal, por haberme embarcado en la investigación en diabetes hace ocho años y por haberme guiado y apoyado durante este camino. Gracias a ti descubrí mi pasión por la investigación en este campo. Gracias a las Dras. Esther Fuentes y Cristina Ripoll, por todos vuestros consejos. Quisiera agradecer su apoyo a las entidades que con su financiación han hecho posible la realización de este proyecto.

No tengo palabras suficientes para agradecer a la Dra. Paloma Alonso Magdalena. Tu respaldo incondicional tanto en la parte científica como en la personal me ha dado fuerzas durante todo este camino. Gracias por haberme enseñado tanto. Dr. Sergi Soriano, gracias por enseñarme a pulir bien las pipetas del *patch*, hacerme reír en cualquier situación y, sobre todo, por estar siempre presente y dispuesto a escuchar.

Mil gracias a la Dra. Beatriz Merino, mi amiga y compañera en los inicios de mi tesis doctoral. Cuando te fuiste pensaba que no iba a sobrevivir sin ti. Gracias por seguir presente en mi vida. A la Dra. Eva Tudurí, porque llegaste al labo para quedarte cuando más te necesitaba, gracias por tus consejos, tu ayuda y todos los cafés que compartimos. Gracias a las Dras. Hilda Herrero y Laura Marroquí y al Dr. Reinaldo Dos Santos, por su colaboración.

A mis compañeras de bancada, las que se fueron y las que aún siguen. Dra. Sabrina Villar, gracias por todo el tiempo que compartimos, dentro y fuera del laboratorio. A Toñi Ruiz, gracias por haber recorrido parte de la aventura conmigo, por nuestros momentos en los congresos y por tu alegría en todo momento. A Talía Boronat y Cristina Quesada, con compañeras como vosotras el camino ha sido mucho más ameno. Muchas gracias, Dr. Jean Vettorazzi, por contagiarme tu felicidad cada día de tu estancia con nosotros. Lucía Almagro, has sido el golpe de aire fresco en el final de mi tesis. Gracias por todos nuestros momentazos recorriendo el sur, por tu resolución y por la fuerza que desprendes.

A nuestras increíbles técnico tengo mucho que agradecerles. Gracias a Luisi Navarro y Salomé Ramón, por acogerme con los brazos abiertos en mis inicios en el laboratorio, por vuestra disposición a ayudarme siempre con cualquier cosa y por vuestra fuerza para sacarlo todo adelante. Sois las mejores.

Gracias a nuestros colaboradores del CABIMER, el Dr. Benoit Gauthier y la Dra. Nadia Cobo-Vuilleumier, por facilitarnos el modelo animal empleado en este trabajo y su apoyo científico. A nuestra compañera del Instituto de Bioingeniería, la Dra. Gema Martínez, gracias por tu gran ayuda. Gracias a nuestros compañeros del servicio de experimentación animal, por toda vuestra asistencia y bromas entre ratón y ratón.

En este momento, no puedo olvidarme de aquellos que han vivido esta tesis desde fuera del laboratorio. Este logro ha sido también gracias a vosotros.

Eva y Malva, mis amigas del alma, gracias por todo vuestro apoyo y hacer que la distancia desaparezca con una llamada.

Gracias a mis padres, Leandro y Eva por su paciencia en esta etapa que parecía que nunca iba a terminar y vuestro ánimo infinito. A mi hermana, Elena, por estar siempre conmigo, por entendernos solo con mirarnos y tu apoyo incondicional. Sin vuestro respaldo hubiera sido imposible llegar a este momento. Gracias a mis abuelos, por guiarme. A la familia que he ganado durante estos años, gracias Manuel, Pepi, José Manuel y Tamara, por vuestro interés constante y transmitirme fuerzas en todo momento.

Mi agradecimiento final y más personal no podría ser para nadie más. Gracias, Luis Miguel, por acompañarme durante todo este camino y darle sentido a la vida. Por hacer que a tu lado todo sea posible. Por darme todo tu apoyo, fuerzas y amor. Esta tesis también es tuya.

